



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Experiencia en el diagnóstico citológico de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con VIH durante 10 años

## TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

LORENA VÁZQUEZ VÁZQUEZ

DIRECTORA: DRA. MA. EUGENIA VÁZQUEZ MANRÍQUEZ

COORDIRECTORA: M. en C. DINA MARTÍNEZ MENDOZA

COORDIRECTORA: M. en I. MA. ANGÉLICA VELÁZQUEZ GONZÁLEZ



Tlalnepantla, Estado de México.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**María Eugenia Vázquez Manríquez**, Médico especialista en Anatomía-Patológica adscrita al servicio de Anatomía Respiratoria del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Profesora titular del curso de alta especialidad en Anatomía Patológica del Aparato Respiratorio en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y Secretaría de Salud. Profesora titular del curso de pregrado de licenciatura en Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México y en la Universidad Autónoma de México.

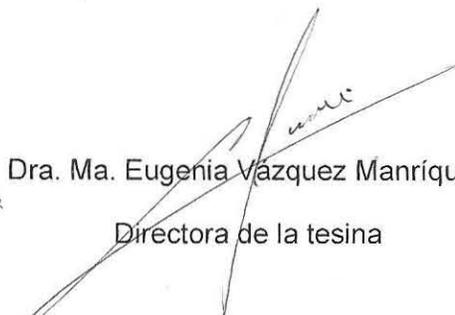
**Dina Martínez Mendoza**, Maestra en Ciencias de la Salud con énfasis en Investigación Clínica. Médico especialista en epidemiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con curso de alta especialidad en tuberculosis fármaco-resistente y sus complicaciones.

**María Angélica Velázquez González**, Maestra en Ingeniería. Investigador "A" adscrita a la Coordinación de Protección Civil Institucional y Gestión Ambiental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

CERTIFICAN:

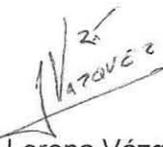
Que la memoria titulada: "**Experiencia en el diagnóstico citológico de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con VIH durante 10 años**", presentada por **Lorena Vázquez Vázquez**, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos para ser leída delante del tribunal correspondiente.

Realizada en el Laboratorio de Citología del servicio de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la Ciudad de México.

  
Dra. Ma. Eugenia Vázquez Manríquez  
Directora de la tesina

  
M. en C. Dina Martínez Mendoza  
Coodirectora

  
M. en I. Ma. Angélica Velázquez González  
Coodirectora

  
Pas. de Biol. Lorena Vázquez Vázquez  
Tesisista

## LUGAR DE DESARROLLO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citología del servicio de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en la Ciudad de México.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que siendo la entidad educativa universitaria más importante en México e Iberoamérica, me otorga el honor de ser puma.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, con su legado de experiencias significativas y fascinantes se convirtió en la cuna de mi profesión y mi pasión.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por la oportunidad de desarrollar la Citología y realizar el presente estudio.

Con particular interés, reitero un consistente y perdurable agradecimiento, por la oportunidad de permitir mi aplicación, desempeño, crecimiento personal y laboral en el servicio de Anatomía Patológica. La realización de este trabajo representa una contribución más que retoma los valores trascendentales para el servicio.

A la Dra. Ma. Eugenia Vázquez Manríquez directora de esta tesina, porque es el resultado de compartir la pasión por la Citopatología. Gracias por sus enseñanzas, consejos y asesoría en diversos congresos, por compartir la experiencia de transmitir ésta particular práctica biomédica a la comunidad de Biología; pero sobre todo, por la amistad invaluable durante tantos años.

A la Maestra en Ciencias, Dina Martínez Mendoza, codirectora que con su imprescindible colaboración, sabiduría y asesoría estadística, dirigió el camino a seguir en este proyecto. Un especial agradecimiento.

A la Maestra en Ingeniería, Ma. Angélica Velázquez González codirectora que me otorgó su apoyo incondicional desde el inicio de este recorrido, impulsó esta tesina con su entusiasmo y orientación continua. Por creer en mí y compartir mis sueños.

A todos y cada uno de mis compañeros patólogos del Servicio de Anatomía Patológica: A la Dra. Ericka Sagrario Peña Mirabal por su cercanía y consejos en diseño y presentación; al Dr. Felipe de Jesús García de León por compartir el interés en los microorganismos, al Dr. José de Jesús López Luna cuya enseñanza me ha proporcionado mayor conocimiento. Al Dr. Daniel Carrasco Daza (†) por el apoyo para la realización de trabajos en los congresos de Patología, por su interés en la correlación cito-histológica y por las tardes agradables. Al Dr. César Luna Rivero por ser un ejemplo a seguir, resolviendo

casos infecciosos. A la Dra. Rosa María Rivera Rosales y el Dr. Elio Germán Recinos Carrera, compañeros cuya colaboración ha sido precisa en mi formación.

A mis compañeras y amigas de extensas jornadas: Cecilia Velasco Villavicencio, valerosa y tenaz en la vida, Alejandra Belmont Caballero por compartir diversos proyectos, Araceli Ramírez Tejeda por su constante ánimo y confianza, Silvia Bautista Ramírez por apoyarme en el laboratorio y a Maura Medina Masadiego, por su atención y disposición para colaborar.

Al servicio clínico de VIH, a los pacientes, a los médicos del CIENI por su confianza en mis diagnósticos, y en especial al Dr. Gustavo Reyes Terán por su apoyo e interés para mi desarrollo en la Micología Médica.

Al jurado que revisó y emitió los comentarios: a la D. en C. Elvia Manuela Gallegos Neyra, una bella persona que con su gran experiencia me mostró que creer es poder, al M. en C. Enrique Montiel Flores con quien compartí los primeros semestres en la licenciatura, al M. en C. José del Carmen Benitez Flores por desbordar su interés en este trabajo y al D. en C. Erick Monroy Pérez por compartir esta agradable historia.

Y finalmente, a todos los profesores de la licenciatura que durante años me han proporcionado palabras de apoyo para seguir adelante y finalizar este añorado proyecto.  
¡Gracias!

## DEDICADO A:

Mis padres María Elena Vázquez Velázquez y Eduardo Vázquez Fuentes que me han dado pertenencia en esta vida. La gratitud que siento hacia ellos por su apoyo e inmenso amor, continúan siendo el pilar de mi fortaleza.

A mis hijos: Luz Elena con quien comparto el proceso de realizar una tesis, Raúl mi asesor en administración y Sofía adolescente que revive momentos de mi vida. Ellos significan mi razón de continuar con satisfacción ya que han alimentando de esperanza, confianza y cariño el proceso de mi desarrollo profesional.

A mis hermanos: Marisol, Alberto, Eduardo y a mi sobrina Marisolita por las frases de aliento y entusiasmo que siempre me otorgaron.

Pero sobre todo a Raúl Jiménez Alvarado, cuyo empeño inquebrantable en que esta tesis saliera adelante, ha sido un cimiento clave en su consecución. Porque este trabajo significa una labor de pareja con la constante lucha para llevar a cabo todas las tareas conjuntas: hogar, hijos, matrimonio, estudio, deporte y desarrollo integral. ¡Te amo!

A mis amigos y compañeros de licenciatura: a Angélica Garduño, Elvia Zavala García, Carlos López Tirado, Mario Crisóstomo Morales, Alejandro Amaya Botello y Socorro Trejo Cedeño con quienes compartí tantas anécdotas y sueños durante el desarrollo académico. Con ellos, comparto el gusto y la admiración al pensamiento: ¡Que viva la Biología!

	i pág.
I. CONTENIDO	i
II. CONTENIDO DE FIGURAS	iv
III. CONTENIDO DE CUADROS	v
IV. ABREVIATURAS	vi
V. RESUMEN	viii
VI. INTRODUCCIÓN	1
1. NEUMONÍA Y NEUMOCISTOSIS	1
1.1. Factores Predisponentes	2
1.2. Afecciones más frecuentes en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	3
1.3. Manifestaciones clínicas	4
2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	6
2.1. Epidemiología mundial de pacientes con el VIH	6
2.2. Epidemiología en México de pacientes con el VIH	7
3. RESEÑA HISTÓRICA DE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	8
4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	9
5. BIOLOGÍA DE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	10
5.1. Morfología y ciclo biológico	10
5.2. Fisiopatología	11
5.3. Estenoxenismo	12
5.4. Co-especiación	12
6. DIAGNÓSTICO DE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	13

6.1. Estudio de la citología	13
6.2. Importancia de la citología pulmonar	13
6.3. Utilidad del lavado bronquial y tinción de Papanicolaou	14
6.4. Métodos de diagnóstico morfológico de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	14
VII. MARCO TEÓRICO	19
VIII. JUSTIFICACIÓN	20
IX. OBJETIVOS	21
1. Objetivo general	21
1.1. Objetivos específicos	21
X. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	22
1. Tipo de estudio	22
1.1 Criterios de inclusión	22
1.2 Criterios de exclusión	22
1.3 Criterios de eliminación	23
1.4 Definición de unidades operacionales	23
2. Diseño de la información	23
3. Técnicas diagnósticas empleadas para <i>Pneumocystis jirovecii</i>	24
4. Concordancia clínico patológica	26
5. Atributos de calidad de muestras citológicas e histológicas	27
XI. RESULTADOS	29
XII. DISCUSIÓN	39
XIII. CONCLUSIONES	49

	iii pág.
XIV. PROYECTOS A FUTURO	51
XV. ANEXOS	52
A.1. Hoja de recolección de datos clínicos y patológicos	52
A.2. Clasificación de los diagnósticos clínicos y patológicos con base a criterios del CIE – 10 de la OMS y la experiencia del servicio de Anatomía Patológica	53
A.3. Fórmula de fijación citológica propuesta por el Dr. Saccomanno	55
A.4. Tinciones de rutina y especiales para la identificación de <i>Pneumocystis jirovecii</i> usadas en el servicio de Anatomía Patológica	56
A.4.1. Tinciones de rutina	56
A.4.2. Tinciones para identificación de hongos	58
A.5. Márgenes propuestos por Byirt para valorar el grado de acuerdo en función al índice de Kappa de Cohen	60
XVI. REFERENCIAS	61

## II. CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1	Placa radiológica simple de tórax de paciente en posición anterior que muestra infiltrado intersticial bilateral	5
Figura 2	Tomografía axial computarizada de tórax con ventana de parénquima pulmonar	5
Figura 3	Ciclo de vida hipotético de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	11
Figura 4	Histología sistemática del alvéolo con adhesión de una forma trófica de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	11
Figura 5	Tejido y células pulmonares con cambios morfológicos por la presencia de <i>Pneumocystis jirovecii</i> con tinciones convencionales	16
Figura 6	Citología de lavado bronquial con presencia de ascas y ascosporas de <i>Pneumocystis jirovecii</i> teñidas con metenammina de plata de Grocott modificado	16
Figura 7	Métodos de diagnóstico morfológico para identificar <i>Pneumocystis jirovecii</i> en lavado bronquial	17
Figura 8	Secuencia de abordaje de casos de pacientes con sospecha y VIH confirmado ingresados en el INER para la búsqueda de <i>Pneumocystis jirovecii</i> por método patológico durante el periodo de 2001 a 2010	27
Figura 9	Distribución de frecuencia de estudios citológicos e histológicos por paciente con diagnóstico clínico de sospecha y VIH confirmado referidos al servicio de Anatomía Patológica	30
Figura 10	Detección y tendencia de <i>Pneumocystis jirovecii</i> en muestras citológicas e histológicas de pacientes con sospecha y VIH confirmado	32
Figura 11	Resultado de la secuencia de abordaje de casos de pacientes con sospecha y VIH confirmado ingresados al INER para la búsqueda de <i>Pneumocystis jirovecii</i> por método patológico durante el periodo de 2001 a 2010	37

## III. CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 1	Espectro de enfermedades pulmonares en pacientes con infección por el VIH	3
Cuadro 2	Clasificación taxonómica de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	10
Cuadro 3	Criterios de consideración en la observación microscópica para definir el diagnóstico de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	24
Cuadro 4	Entidades etiológicas descritas en las variables de diagnóstico clínico y patológico	25
Cuadro 5	Criterios de evaluación de calidad para las muestras citológicas e histológicas remitidas al servicio de Anatomía Patológica	26
Cuadro 6	Diagnóstico clínico de ingreso al INER en pacientes con sospecha y VIH confirmado durante el periodo de 2001 a 2010	28
Cuadro 7	Principales diagnósticos de patologías respiratorias asociadas a pacientes con sospecha y VIH confirmado	29
Cuadro 8	Tipos de estudio y tipos de muestras solicitadas de pacientes con diagnóstico de sospecha y VIH confirmado	31
Cuadro 9	Resultado diagnóstico de <i>Pneumocystis jirovecii</i> en muestras citológicas e histológicas	32
Cuadro 10	Asociación de <i>Pneumocystis jirovecii</i> con otros organismos y enfermedades respiratorias	33
Cuadro 11	Concordancia para <i>Pneumocystis jirovecii</i> entre el diagnóstico clínico y patológico de muestras realizadas a pacientes con sospecha y VIH confirmado	34
Cuadro 12	Evaluación de calidad en muestras pulmonares con base al diagnóstico emitido en el servicio de Anatomía Patológica	34
Cuadro 13	Diagnósticos patológicos de muestras consideradas adecuadas por la evaluación de calidad con certeza inespecífica para <i>Pneumocystis jirovecii</i>	35
Cuadro 14	Descripción del diagnóstico de muestras consideradas como inadecuadas por la evaluación de calidad	36
Cuadro 15	Descripción por año y tipo de estudio de muestras consideradas inadecuadas por la evaluación de calidad	36

## IV. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Alteraciones Inflammatorias
AP	Anatomía Patológica
Arvs	Antirretrovirales
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BAAF	Biopsia por aspiración con aguja fina
BAC	Bacterias
BATB	Biopsia por aspiración transbronquial
Bx	Biopsia pulmonar
CB	Cepillado bronquial
CDC*	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CIE	Clasificación Internacional de Enfermedades
CIENI	Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas
Cx	Citológico
CMV	Citomegalovirus
Dx Cli	Diagnóstico Clínico
Dx Pat	Diagnóstico Patológico
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
EUA	Estados Unidos
EXP	Expectoración
FBC	Fibrobroncoscopia
HE	Hematoxilina y eosina
ICBN*	Código Internacional de Nomenclatura Botánica
ICZN*	Código Internacional de Nomenclatura Zoológica
ICQ	Inmunocitoquímica
Hx	Histológico
IF	Inmunofluorescencia
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INCAN	Instituto Nacional de Cancerología
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INP	Instituto Nacional de Pediatría

ISO*	Organización para la Estandarización Internacional
K	Kappa
LB	Lavado bronquial
LBA	Lavado bronquioalveolar
Mic	Micosis
Myc	Micobacterias
NCBI	Centro Nacional de Información en Biotecnología
Neo	Neoplasia
Neu	Neumonía
NI	Neumopatía Intersticial
OMS	Organización Mundial de la Salud
PcP*	Neumonía por <i>Pneumocystis</i>
PAP	Papanicolaou
PAS*	Ácido peryódico de Schiff
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa
Pj	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
sK	Sarcoma de Kaposi
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SA	Sin Alteraciones
SS	Secretaría de Salud
TAC	Tomografía Axial Computarizada
TARAA	Terapia antirretroviral altamente activa
Tb	Tuberculosis
USG	Ultrasonografía
Vir	Virales
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
ZN	Ziehl Nielsen

\*Por sus siglas en inglés

## V. RESUMEN

*Pneumocystis jirovecii* (Pj), es el microorganismo fúngico oportunista considerado como la causa más importante de neumonía con un alto índice de morbi-mortalidad que afecta a individuos con una inmunosupresión severa. El tratamiento depende de su diagnóstico oportuno, ya que es difícil de cultivar por medios microbiológicos y es necesario utilizar otros métodos de detección.

Con la finalidad de fortalecer los procedimientos involucrados en el diagnóstico citológico, se realizó un análisis descriptivo a partir de los datos recopilados de muestras pulmonares referidas al servicio de Anatomía Patológica, procedentes de 893 pacientes con diagnóstico clínico confirmado y de probable Virus de la Inmunodeficiencia Humana que acudieron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias entre el periodo de 2001 a 2010. La descripción contempló el perfil poblacional de pacientes, el tipo de muestras utilizadas para la búsqueda de *Pneumocystis jirovecii*, el número de casos positivos, la correlación clínico - patológica y los criterios patológicos para considerar la evaluación de atributos de calidad.

Se revisaron 2300 estudios citológicos e histológicos; la revisión de las muestras consideró al lavado bronquial y la biopsia pulmonar como las más representativas y con los mejores resultados en las tinciones especiales. Del total, 401 muestras examinadas por el método patológico definieron la presencia de *Pneumocystis jirovecii* en 235 muestras citológicas y 166 muestras histológicas. Éstas correspondieron a 196 pacientes y 20 de ellos obtuvieron el diagnóstico con una sola muestra de tipo citológica. Se calculó estadísticamente la concordancia entre los diagnósticos clínico y patológico que resultó confiable para los casos evidentes. Se evaluó la calidad de las muestras por adecuación y certeza, hallando que los métodos de obtención utilizados son apropiados, representativos del sitio de muestra y con buena conservación en la mayoría de los casos.

El estudio concluyó que los procedimientos involucrados para definir el diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* es confiable y que el método citológico representa una excelente práctica que permite la inclusión de variaciones metodológicas para lograr mayor eficacia en el proceso integral.

## VI. INTRODUCCIÓN

### 1. NEUMONÍA Y NEUMOCISTOSIS

El sistema respiratorio implica la constante exposición de las superficies epiteliales del árbol pulmonar a diversos contaminantes aéreos así como la aspiración de flora nasofaríngea durante el sueño, condiciones que colocan al tracto traqueobronquial vulnerable a organismos patógenos. Aunque existe gran variedad de mecanismos de defensa inmunológica y no inmune, sus defectos y alteraciones producidos por factores exógenos y endógenos conducen a incrementar la incidencia de infecciones. La neumonía infecciosa es una de las enfermedades más comunes en adultos mayores y niños (Murdoch, 2003), que se define como cualquier infección pulmonar aguda y fulminante o crónica con un curso prolongado (Kumar y Cotran, 2003). Uno de los grupos más afectados, es el de pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida (VIH) ya que, el 65 % de los padecimientos asociados al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pertenecen a infecciones oportunistas pulmonares (Magis y Del Río, 2000), considerando a la neumonía como una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad (Calderón *et al.*, 2003; Cordero *et al.*, 2003).

Entre las enfermedades infecciosas, las micosis se presentan como otra causa de patología respiratoria en los pacientes con el VIH y se encuentran en aumento considerable en las dos últimas décadas (Wagner y Chaisson, 2004). Todas las micosis en un principio son oportunistas; el estado inmunológico es lo que determina la gravedad de la infección en el paciente. La clasificación de enfermedades micóticas propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las divide en superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas; éstas últimas intrínsecamente relacionadas con el sistema respiratorio (López *et al.*, 2004). Actualmente la epidemiología de complicaciones pulmonares en pacientes con infección por el VIH depende de la conducta social y de los factores socioeconómicos así como del acceso y aceptación a la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) (Del Campo-Rodríguez y Sifuentes-Osornio, 2004).

La neumocistosis ("*Pneumocystis Pneumonia*" ó PcP por sus siglas en inglés) es la enfermedad causada por un hongo del género *Pneumocystis*. Se manifiesta principalmente como una infección oportunista que produce una neumonía grave en mamíferos profundamente inmuno comprometidos. En el caso del hombre, la especie

*Pneumocystis jirovecii* (Pj) (descrito por Frenkel, 1976) es, hasta ahora, el único agente causante conocido de PcP. Esta enfermedad cosmopolita constituye probablemente la afección respiratoria más frecuente observada en pacientes inmunodeprimidos en el mundo con gran impacto en el inicio de la pandemia del SIDA en 1986 y actualmente, plantea todavía importantes retos diagnósticos, terapéuticos y preventivos (Dei-Cas *et al.*, 2008 y 2011).

### 1.1. Factores predisponentes

Debido a la infección por el VIH, en los sistemas inmunitarios humoral y celular ocurren múltiples anormalidades cuantitativas y funcionales, la mayor parte como consecuencia de la eliminación de linfocitos T cooperadores, también denominados CD4. Sin embargo, antes de que ocurra esta pérdida numérica, los pacientes presentan respuestas anormales de linfocitos T y B, así como de monocitos y macrófagos. Estas anormalidades son resultado de la infección viral latente. La pérdida progresiva de linfocitos cooperadores disminuye consecuentemente los niveles de linfocinas y citocinas, y altera la respuesta de defensa (Magis y Del Río, 2000).

En los pulmones se observan alteraciones inmunológicas similares. La función de los macrófagos alveolares, básica para el desarrollo de una adecuada respuesta inflamatoria alveolar, se encuentra afectada por la deficiencia de linfocinas estimulantes; sin embargo, al parecer esta función permanece latente, al menos en relación con la interleucina IL-1 y el factor de necrosis tumoral en diversos estadios de la infección por el VIH independientemente de la carga viral existente en dichas células (*op cit*).

Deben reconocerse ciertos factores de riesgo que incrementan la adquisición de una infección pulmonar en pacientes con el VIH como son: la localización geográfica, la forma de adquisición del virus, la exposición endémica a otros patógenos o la instalación de infecciones oportunistas previas pues algunas recidivan si no se realiza una profilaxis secundaria o un tratamiento mantenido en los pacientes. Igualmente los antecedentes epidemiológicos de interés como el contacto con enfermos con tuberculosis, la estancia en prisión o los hábitos toxicológicos son importantes para la búsqueda del agente causal (Cordero *et al.*, 2003; Magis y Del Río, ,2000).

## 1.2. Afecciones más frecuentes en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia Humana

En cuanto al deterioro de los órganos, se señala al aparato respiratorio como el más afectado (42 %), seguido por el aparato digestivo (29 %), los concernientes al sistema linfático (25 %) y finalmente los pertenecientes al sistema nervioso central (11 %) (Del Campo-Rodríguez y Sifuentes-Osornio, 2004). Las principales complicaciones pulmonares que dañan a pacientes con el VIH se aprecian en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Espectro de enfermedades pulmonares en pacientes con infección por el VIH**

ENFERMEDADES INFECCIOSAS	ENFERMEDADES NO INFECCIOSAS
Neumonía bacteriana	Neoplásicas
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sarcoma de Kaposi
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cáncer broncogénico
<i>Haemophilus influenzae</i>	Linfoma no - Hodgkin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Enfermedad de Hodgkin
<i>Legionella spp.</i>	Inflamatorias
<i>Rhodococcus equi</i>	Neumonitis intersticial no específica
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Neumonitis intersticial linfocítica
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Bronquitis linfocítica
<i>Nocardia asteroides</i>	Bronquiolitis obliterante con neumonía organizada
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Bronquiectasias
Infecciones por Micobacterias	Vasculares
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hipertensión arterial pulmonar primaria
<i>Mycobacterium avium intracellulare</i>	
<i>Mycobacterium kansasii</i>	
Otras Micobacterias no tuberculosas	
Infecciones por hongos	
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	
<i>Aspergillus spp.</i>	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	
<i>Histoplasma capsulatum</i>	
<i>Coccidioides immitis</i>	
<i>Penicillium mameffeii</i>	
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	
<i>Candida albicans</i>	
Infecciones virales	
Citomegalovirus	
Herpes simplex virus	
Varicella zoster	
Virus de la influenza	
Virus de Epstein Barr	
Virus sincitial respiratorio	
Adenovirus	
Paramyxovirus	
Infecciones parasitarias	
<i>Toxoplasma gondii</i>	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	
<i>Acanthamoeba spp.</i>	

Modificado de Vega y Reyes, 2005

Es posible que existan complicaciones en el curso de cualquier enfermedad pulmonar al manifestarse simultáneamente más de una entidad patógena y síntomas clínicos confusos (Kumar y Cotran, 2003). Del Campo-Rodríguez y Sifuentes-Osornio (2004), consideraron que la participación de las infecciones oportunistas es la más frecuente (68 %), seguida por la combinación de infección oportunista y neoplasia (34 %), luego de neoplasia sola (4.6 %) y finalmente un grupo pequeño de casos sin evidencia de alteraciones (1 %).

### 1.3. Manifestaciones clínicas

Considerando que los niveles de referencia normales de linfocitos CD4 se encuentran entre 600 y 1200 (cél./mm<sup>3</sup>), La PcP puede ocurrir en cualquier grado de inmunosupresión en pacientes con niveles menores a 200 (cél./mm<sup>3</sup>) y que no han recibido tratamiento profiláctico; sin embargo, es más común en personas con inmunodeficiencia severa y niveles de CD4 menores a 100 (cél./mm<sup>3</sup>). Los síntomas no son específicos; en pacientes con el VIH se observa con frecuencia un curso clínico subagudo tardío después de varias semanas (Bennett *et al.*, 2009; Kumar y Cotran, 2003). Los signos y síntomas incluyen:

- Disnea progresiva (95 %)
- Fiebre (80 %)
- Tos no productiva (95 %)
- Dolor en pecho
- Baja de peso
- Enfriamiento
- Hemoptisis (raro)
- Fiebre
- Taquicardia
- Taquipnea
- Crepitaciones pulmonares y ruidos leves

En niños con enfermedad severa puede encontrarse también:

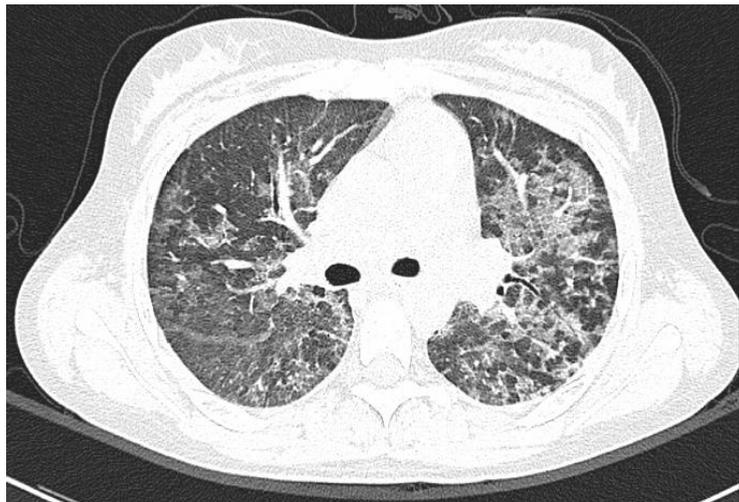
- Cianosis
- Retracción intercostal
- Esgurrimiento nasal

La radiografía de tórax constituye una prueba fundamental e importante en el diagnóstico de estos pacientes, aunque no existen imágenes radiológicas patognomónicas. La mayoría presentan infiltrados difusos perihiliares traducidos como “vidrio deslustrado” y un patrón reticular o reticulonodular hiliofugaz que puede progresar a un patrón alveolar bilateral (Fig. 1). Los estudios por tomografía axial computarizada (TAC) también son útiles (Fig. 2). Puede observarse un patrón radiológico normal hasta en el 26 % de los pacientes, (Cordero *et al.*, 2003), pasar

inadvertido en las primeras etapas y presentarse tardíamente hasta en 5 a 10 % de los casos. En 20 % de los enfermos, el patrón radiológico es atípico con consolidación lobar, afección localizada a lóbulos superiores que semeja tuberculosis (Tb), consolidación unilateral, nódulos y linfadenopatía mediastínica, (Magis y Del Río, 2000; Nawaz, *et al.* 2008).



**Figura 1.** Placa radiológica simple de tórax de paciente en posición anterior que muestra infiltrado intersticial bilateral con un patrón en “vidrio deslustrado” generalizado con zonas de hiperclaridad hacia las regiones de los lóbulos superiores compatibles con la presencia de Pj. Cortesía del Dr. Fortunato Juárez, servicio de Imagenología, INER



**Figura 2.** Tomografía axial computarizada de tórax con ventana de parénquima pulmonar con patrón de “vidrio deslustrado” bilateral compatible con la presencia de Pj. Cortesía del Dr. Fortunato Juárez, servicio de Imagenología, INER

## 2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Pneumocystis jirovecii*

La enfermedad se ha descrito en pacientes inmunocomprometidos por muchos años, incluyendo brotes en niños y jóvenes mal nutridos en orfanatos en Irán en los años 1950s. Sin embargo, la epidemia del SIDA marcó el principio del impacto de la enfermedad en un número substancial de pacientes. La introducción de una terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) para el tratamiento de la infección por el VIH, conduce a la reducción del índice de mortalidad y la incidencia de infecciones oportunistas, incluyendo la PcP. Sin embargo, Pj sigue siendo un patógeno importante en los pacientes con el VIH que no reciben o no responden al TARAA e incluso en aquellos que desconocen su condición como portadores del VIH. Esta infección también es importante en pacientes que han recibido trasplantes de órganos o que reciben quimioterapia por enfermedades malignas. Finalmente se les ha descrito en personas que presentan inmunocompromiso medio, incluyendo aquellos con enfermedad pulmonar crónica, (Del Campo-Rodríguez y Sifuentes-Osornio, 2004; Bennett, *et al.* 2009).

### 2.1. Epidemiología mundial de pacientes con el VIH

En los años siguientes a la segunda guerra mundial se reportaron agrupaciones epidémicas de casos de PcP que llegaron con las epidemias del oeste de Europa en hospitales y unidades de trasplante de órganos. En los Estados Unidos (EUA), los reportes hasta 1980 fueron un poco menos de 100 casos de PcP por año, ocurriendo en pacientes inmunosuprimidos por cáncer y/o tratados con quimioterapia así como en pacientes transplantados que recibieron agentes inmunosupresores (Bennett *et al.*, 2009).

La PcP, ha llegado a ser la más frecuente y letal infección oportunista asociada al SIDA en los EUA. El incremento comienza en 1981 cuando se diagnostican los primeros casos del SIDA. El centro para el control y la prevención de enfermedades (CDC) reportó PcP en cinco hombres homosexuales previamente sanos, residentes en el área de los Ángeles, California. En pocos meses se diagnosticaron en otros países, incluyendo a México. En los primeros 27 años transcurridos desde entonces, se han infectado con el VIH más de 65 millones de personas en todo el mundo y han fallecido por esa causa más de 25 millones, *op. cit.* En 1984 el CDC reportó 2008 casos del SIDA en el periodo de junio de 1981 a agosto de 1983; donde los indicadores más comunes fueron la Pj, sarcoma de Kaposi (sK) o ambos (Masachika, 1984).

Los trabajos de Bartlett y Smith (1991), refieren cientos de casos de PcP en niños de orfanatos o con otras condiciones de hacinamiento. Se observaron casos en más países del mundo, pero su incidencia fue variada. Existen informes específicos de casos de Johannesburgo, Puerto Rico y Escandinavia, mientras que en América del Norte, aproximadamente del 60 al 80 % de los pacientes con el SIDA desarrollan neumonía por Pj, por lo menos una vez. En contraste, estimaron que en África, sólo el 7 % de los pacientes con el SIDA desarrollaron PcP y la enfermedad fue observada en pacientes africanos radicados en Europa así como en infantes vietnamitas adoptados.

En el trabajo de Caro-Murillo *et. al.* (2007) sobre una cohorte de pacientes con riesgo de infección por el SIDA en España, señalan que en el periodo de un año, se detectaron 16 % de pacientes latinoamericanos, 5 % de africanos subsaharianos, 3 % de europeos occidentales y 3 % entre europeos del este, africanos del norte y asiáticos residentes en este país; además del 73 % de pacientes autóctonos; refiriendo que las enfermedades diagnosticadas más frecuentes ocurrieron por Pj (6.1 %), candidiasis esofágica (3.3 %), tuberculosis extrapulmonar (3.0 %) y tuberculosis pulmonar (2.7 %).

En el año 2009 la prevalencia de Pj en el mundo era mucho menor en regiones en desarrollo, pero los estudios han demostrado que la baja incidencia es debida probablemente al fracaso en el diagnóstico. Actualmente en África, la frecuencia documentada es mayor por Pj encontrándose en más del 80 % de niños con neumonía e infección por el VIH. En África sub-sahariana, es común la coinfección con tuberculosis. En los EUA se ha reportado entre el 20 y el 40 % en pacientes con el VIH dependiendo de la presentación y severidad de la enfermedad (Bennett *et al.*, 2009).

## 2.2. Epidemiología en México de pacientes con el VIH

La recopilación de Casanova en 2006, incluye:

- En 1989, en el Centro Médico "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se analizó una serie de 131 casos de pacientes con SIDA en el Hospital de Infectología y refirió el diagnóstico de Pj en un 13 % sin especificar la metodología diagnóstica. Para 1992, el mismo Centro Médico, realizó otro estudio prospectivo de pacientes con diagnóstico del SIDA y neumonía intersticial que demostró a Pj en 51 % de 128 pacientes en un periodo de 18 meses.
- Durante el VI Congreso internacional del SIDA celebrado por la CDC en Roma en 1991, se describieron 177 defunciones en cuatro hospitales de la Ciudad de México, cuyas autopsias demostraron a Pj en el 24 % de los casos.

- El Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) informó en su boletín mensual que para el 31 de diciembre de 1991 existían 844 casos de PcP en 6914 pacientes con el SIDA, lo que representa el 12.21 %.

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), institución de alta especialidad perteneciente a la Secretaría de Salud (SS), enfatizó en 1998 la importancia que reflejó el desplazamiento en la atención médica para pacientes con el SIDA en relación con manifestaciones respiratorias por neumonía o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); y para 1999, consideró al SIDA como la primera causa de morbilidad por enfermedad infecciosa y la segunda causa de mortalidad general detrás del cáncer pulmonar, siendo la neumonía la causa principal de morbilidad y mortalidad en los pacientes infectados con el VIH (Reyes-Terán, 2001). Otro estudio retrospectivo sobre la frecuencia de las diferentes infecciones oportunistas pulmonares de pacientes ingresados entre 1991 y 2001 al INER por el SIDA con manifestaciones respiratorias, resaltó las tres principales causas de hospitalización: neumonía por Pj como la más frecuente, en segundo lugar la tuberculosis pulmonar y finalmente neumonías causadas por diversos agentes etiológicos como bacterias y otras micosis (García-Sancho *et al.*, 2003).

### 3. RESEÑA HISTÓRICA DE *Pneumocystis jirovecii*

Carlos Chagas en Brasil, descubrió por primera vez las formas quísticas de *Pneumocystis* en 1909 mientras evaluaba medidas de profilaxis contra la malaria. Pensó erróneamente que formaban parte de un proceso esquizogónico de *Trypanosoma cruzi* y propuso nombrarlo como *Schizotrypanum lewisi*, (Aliouat, *et al.*, 2009; Beck, *et al.*, 2009).

En 1910, Antonio Carini encontró quistes similares en pulmones de ratas infectadas y envió muestras de tejido al Instituto Pasteur en donde más tarde, Pierre y Marie Delanöe los encontraron además, en ratas de las alcantarillas de París que no estaban infectados por *Trypanosoma*. Llegaron a la conclusión de que los cuerpos quísticos pulmonares reportados por Chagas y Carini eran de hecho, una nueva entidad biológica relacionada con los protozoos coccidios. Sugirieron nombrarlo *Pneumocystis carinii*: "Pneumo" en relación con tropismo pulmonar "cystis" debido a su forma típica y "carinii" en honor al Dr. Antonio Carini, (Aliouat, *et al.*, 2009).

En 1942, Van der Meer y Brug publicaron las primeras fotografías de microscopía de luz de quistes y formas tróficas, y Vanek, Jirovec y Lukes, en Checoslovaquia 1951, corroboraron dichas descripciones al descubrir infinitos quistes en los pulmones de niños fallecidos por neumonitis intersticial. En 1973, Frenkel postuló diferencias inmunológicas entre las especies del hombre y la rata cuando los anticuerpos procedentes de suero de ratas no reaccionaban con los aislados de humano, aunque lo hacían ávidamente con los derivados de rata. Así, sugiere por primera vez que el organismo que produce patología en el hombre debería denominarse de otra forma. Propone el nombre de *Pneumocystis jirovecii* en honor del parasitólogo checo Otto Jirovec, que en los años cincuenta había identificado a *Pneumocystis* como la causa de la neumonitis de células plasmáticas que afectaba a niños de orfanatos europeos, (Álvarez, 2008).

Bajo el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN por sus siglas en inglés) celebrado en el Código de St. Luis (Greuter, *et. al.*, 2000), los nombres *Pneumocystis* y *P. carinii* podrían ser inválidos, pero fueron reconocidos con indulgencia por el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN por sus siglas en inglés). Debido a los cambios adoptados en el ICBN en el Código de Viena, estos nombres son aceptados y validados en virtud de la revisión del artículo 45.1 (McNeill *et. al.*, 2012) En la misma publicación fueron tipificadas distintas especies de *Pneumocystis* y actualmente el seguimiento del árbol ha descrito formalmente a otras especies además de *Pneumocystis jirovecii*, (Redhead *et. al.*, 2006).

#### 4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Pneumocystis jirovecii*

*Pneumocystis* describe un género de hongos unicelulares de baja virulencia que se encuentran en los pulmones de diversos mamíferos, inclusive el ser humano. La situación taxonómica del género se resolvió al final de los 80 cuando los análisis de la secuencia 18s del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) sugirieron que dicho microorganismo está relacionado de forma más cercana con los hongos que con los protozoos. Esta conclusión se ha reforzado mediante el análisis de la secuencia genómica de los genes que codifican la dihidrofolato reductasa, la timidilato sintetasa, la tubulina y las actinas, así como mediante la demostración de la presencia del factor de elongación 3, un elemento necesario para la síntesis de proteínas, que se encuentra en los hongos, pero no en los protozoos. Los estudios filogenéticos han sugerido que el organismo está relacionado de forma más estrecha con los ascomicetos, (Álvarez, 2008). Ver Cuadro 2.

**Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Pneumocystis jirovecii***

SUPERREINO:	EUCARIOTA	Cavalier - Smith, 1998*
REINO:	FUNGI	Cavalier - Smith, 1998*
SUBREINO:	DIKARYA	James y Vilgalys, 2007**
FILO:	ASCOMYCOTA	Eriksson, 1999**
SUBFILO:	THAPRINOMYCOTINA	Eriksson y Winka, 1997
CLASE:	PNEUMOCYSTIDOMYCETES	Eriksson y Winka, 1997
ORDEN:	PENUMOCYSTIDALES	Eriksson, 1994**
FAMILIA:	PNEUMOCYSTIDACEAE	Eriksson, 1994**
GÉNERO:	<i>Pneumocystis</i>	Delanöe y Delanöe, 1912
ESPECIE:	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Frenkel, 1976

(Catalogue of life 2011; NCBI, 2010 y Lumbsch y Huhndorf, 2007) \*Versión del sistema taxonómico basado en dos suprareinos y seis reinos de la clasificación de cinco reinos según Whittaker, 1969. \*\* Versión del sistema taxonómico mas reciente basado en el estudio de las secuencias del gene 18S RNAr (Stchigel, 2000)

## 5. BIOLOGÍA DE *Pneumocystis jirovecii*

### 5.1. Morfología y ciclo biológico

*Pneumocystis jirovecii* posee los organelos típicos de una célula eucariota que son: un núcleo verdadero rodeado por una membrana, mitocondrias y un sistema endomembranoso bien desarrollado que comprende un retículo endoplásmico complejo con sáculos especializados, lisosomas y un aparato de Golgi.

Las formas tróficas (2 a 8 µm de diámetro), mononucleadas, ameboides, con pared celular fina y presencia de filópodos se transforman en esporocitos redondeados (3 a 6 µm) y luego en ascas (4 a 6 µm) que cuando maduran, contienen ocho esporas o ascosporas y abandonan el quiste por un orificio preformado. Los esporocitos presentan tres estadios de desarrollo (precoz, intermediario y tardío) en función del número de núcleos (hasta ocho núcleos) y de la estructura en la pared celular. La primera división es haploide y ocurre en el esporocito precoz, en el que se observan complejos sinaptonemales lo cual demuestra que esta división es reduccional o meiótica. En el esporocito intermediario se agrega una capa media poco densa rica en beta-glucanos y una membrana plasmática que perdurará en el quiste maduro o asca. Las formas tróficas jóvenes emergen del asca y se adhieren a los neumocitos tipo 1 y reinician el ciclo. En ellas ocurre el proceso de fusión nuclear por conjugación y se restituye la diploidía. (Fig. 3) (Dei-Cas *et al.*, 2011; Smulian *et al.*, 2001).

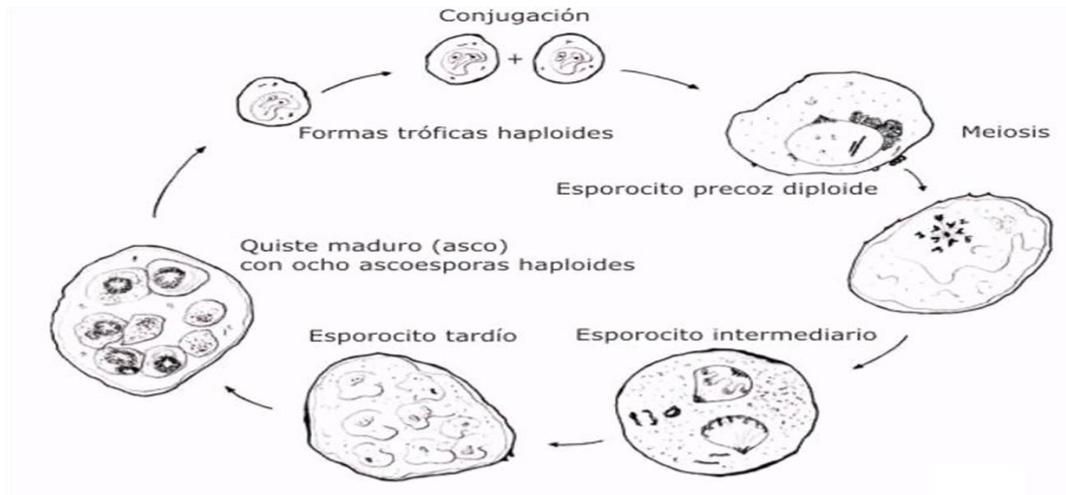


Figura 3. Ciclo de vida hipotético del género *Pneumocystis* que muestra tres estadios de desarrollo (precoz, intermedio y tardío), en función de las divisiones nucleares sucesivas y de los cambios en su pared celular. Tomado de Dei-Cas *et al.*, 2011

## 5.2. Fisiopatología

Una vez que se inspira el esporocito precoz de Pj, se desarrolla un parasitismo extracelular en el área de intercambio gaseoso. Su hábitat es el alvéolo pulmonar en el que se adhieren específica e íntimamente a los neumocitos tipo I que cubren más del 90 % del espacio alveolar. Sus filópodos (finas prolongaciones citoplasmáticas) se adhieren a la membrana de la célula huésped provocando una deformación en su superficie y junto a éstos, se integra una capa densa que tapiza toda la extensión celular. La fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular participan en este fenómeno que se produce sin fusión ni ruptura de membranas. En las primeras fases de la infección, los neumocitos tipo I no sufren alteraciones visibles (Fig. 4) (López *et al.*, 2004).

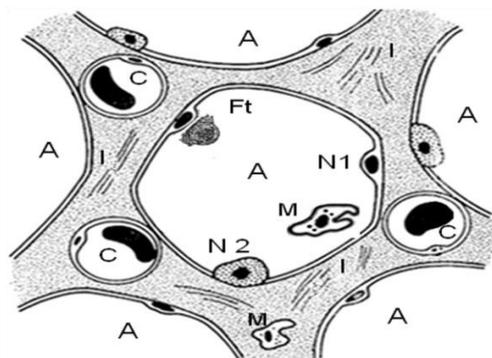


Figura 4. Histología sistemática del alvéolo con adhesión de una forma trófica de *Pneumocystis jirovecii*. A) Espacios alveolares, C) Capilares, N1) Neumocitos tipo I, N2) Neumocitos tipo II, M) Macrófagos, I) Tejido intersticial, Ft) Forma trófica. Modificado de Cruz, 2010

Posteriormente la membrana basal del epitelio incrementa su grosor debido a una reacción inflamatoria y se produce edema en la pared alveolar. Las cavidades alveolares afectadas se llenan de parásitos, macrófagos que los fagocitan y destruyen activamente, y de células epiteliales descamadas asociadas a veces con linfocitos y neutrófilos polimorfonucleares. Este proceso representa histopatológicamente el “exudado” eosinófilo intra-alveolar típico de la neumocistosis que asocia a los elementos celulares mencionados, glicoproteínas adhesivas de la matriz extracelular, inmunoglobulinas, otras proteínas del huésped y surfactante producido por neumocitos tipo II (Fig. 5). El proceso conduce a una respuesta reparadora por parte de éstos últimos que desarrollan histológicamente hiperplasia e hipertrofia, ocasionando un cuadro clínico en el paciente de insuficiencia respiratoria y en fases más tardías, un proceso de fibrosis (López *et al.*, 2004).

### 5.3. Estenoxenismo

La divergencia genética es típica del género, ya que existen reportes de diferentes especies de *Pneumocystis* que presentan diferencias con base al análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN). Investigaciones a nivel genómico, cariotípico e isoenzimático revelaron un polimorfismo genético importante perfectamente correlacionado con una estrecha especificidad parasitaria. Esto se demostró, al observar en los aislados de *Pneumocystis* de mamíferos de una misma especie, homogeneidad genética suficiente para distinguirlos de los aislados de otros mamíferos. Experimentalmente se confirmó por la imposibilidad de reproducir infecciones cruzadas entre diferentes especies de mamíferos tales como ratas, ratones y conejos (Dei-Cas *et al.*, 2008).

### 5.4. Co - especiación

Durante casi un siglo se consideró a “*Pneumocystis carinii*” como entidad taxonómica única, hoy está bien establecido que ésta denominación incluye un grupo heterogéneo de poblaciones genéticamente aisladas que han sufrido un largo proceso de adaptación a cada especie de mamífero huésped. Por ésta razón, las definiciones biológica y filogénica de especie se aplican a las subpoblaciones de *Pneumocystis* adaptadas específicamente a cada mamífero. Esta nueva concepción conduce a aceptar la existencia de un nuevo grupo de microorganismos eucariotas, parásitos pulmonares de mamíferos, dotados de un potencial patógeno considerable y ampliamente distribuidos en los ecosistemas (*op cit*).

## 6. DIAGNÓSTICO DE *Pneumocystis jirovecii*

### 6.1. Estudio de la citología

La citología es una herramienta diagnóstica basada en técnicas rápidas y simples que se ocupan de la interpretación morfológica de las células de los seres vivos. Su evaluación se realiza sobre células aisladas descamadas libremente de las superficies epiteliales o extraídas de diferentes regiones orgánicas por medio de procedimientos diversos con el objetivo de interpretar las lesiones presentes. Comprende una labor asistencial que inicialmente se utilizó como método de diagnóstico para neoplasias benignas, malignas o sospechosas; sin embargo los criterios citológicos aportan datos que permiten ampliar su utilidad hacia otros campos como el diagnóstico de microorganismos causantes de infecciones (Wied, 1992). Su principal ventaja sobre la biopsia es la posibilidad de realizar muestreo de la lesión mucho más amplio y reiterado, de manera que permite realizar un seguimiento dinámico de la conducta de las lesiones.

### 6.2. Importancia de la citología pulmonar

Desde hace 40 años, se ha mantenido un particular interés en aplicar los principios del diagnóstico citopatológico en la interpretación del tracto respiratorio bajo, basándose en especímenes que incluyen como método no invasivo al esputo obtenido por expectoración (EXP) espontánea o inducida y considerados como semi - invasivos tanto al aspirado traqueal, lavado bronquial (LB), cepillado bronquial (CB) y biopsia pulmonar (Bx) recolectados por fibrobroncoscopia (FBC) así como la biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF) y biopsia por aspiración transbronquial (BATB) apoyada de la Tomografía Axial Computarizada (TAC) o la Ultrasonografía (USG) (Young, 1996).

El papel del laboratorio de patología en el diagnóstico de infecciones oportunistas amerita mayor consideración ya que un número de esos agentes infecciosos se prestan fácilmente a la detección y correcto diagnóstico por principios y métodos citológicos (Johnston, 1992). Para la neumonía por Pj, el tratamiento correcto depende de su detección temprana y puesto que se le considera un microorganismo fúngico atípico por su difícil cultivo en medios microbiológicos y su insensibilidad a la mayoría de las moléculas antifúngicas, es necesario utilizar otros métodos de detección, (Dei-Cas *et al.*, 2008).

### 6.3. Utilidad del lavado bronquioalveolar y tinción de Papanicolaou

Una de las herramientas indicada para la mayoría de las anomalías pulmonares la constituye la FBC que es considerada quizá la más útil en el diagnóstico, estadificación y manejo de la patología pulmonar (El-Bayoumi y Silvestri, 2008; Grupo consenso AABE, 2009). La obtención del LB, es utilizada para la valoración de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial así como para evaluación microbiológica y citopatológica, especialmente en individuos inmunosuprimidos, a los cuales proporciona un seguro y efectivo medio de investigación en infiltrados de etiología desconocida (Young, 1996). Pueden obtenerse diferentes productos como células epiteliales del tracto respiratorio, células inflamatorias y otros elementos acompañantes como partículas de polvo, microorganismos, células tumorales, hemosiderófagos, agregados acelulares como proteína alveolar y solutos del tracto respiratorio (Johnston, 1992). En este procedimiento, una vez introducido el fibrobroncoscopio al árbol traqueobronquial, se instila la solución fisiológica, misma que se extrae después de haber inundado el área de interés. El material destinado para investigación patológica, es fijado con solución de Carbowax según la técnica de Saccomano (Johnston y Frable, 1979), procesado y teñido con el método de Papanicolaou (PAP) (Johnston, 1992), lo que permite analizar la muestra bajo microscopio óptico para su interpretación diagnóstica.

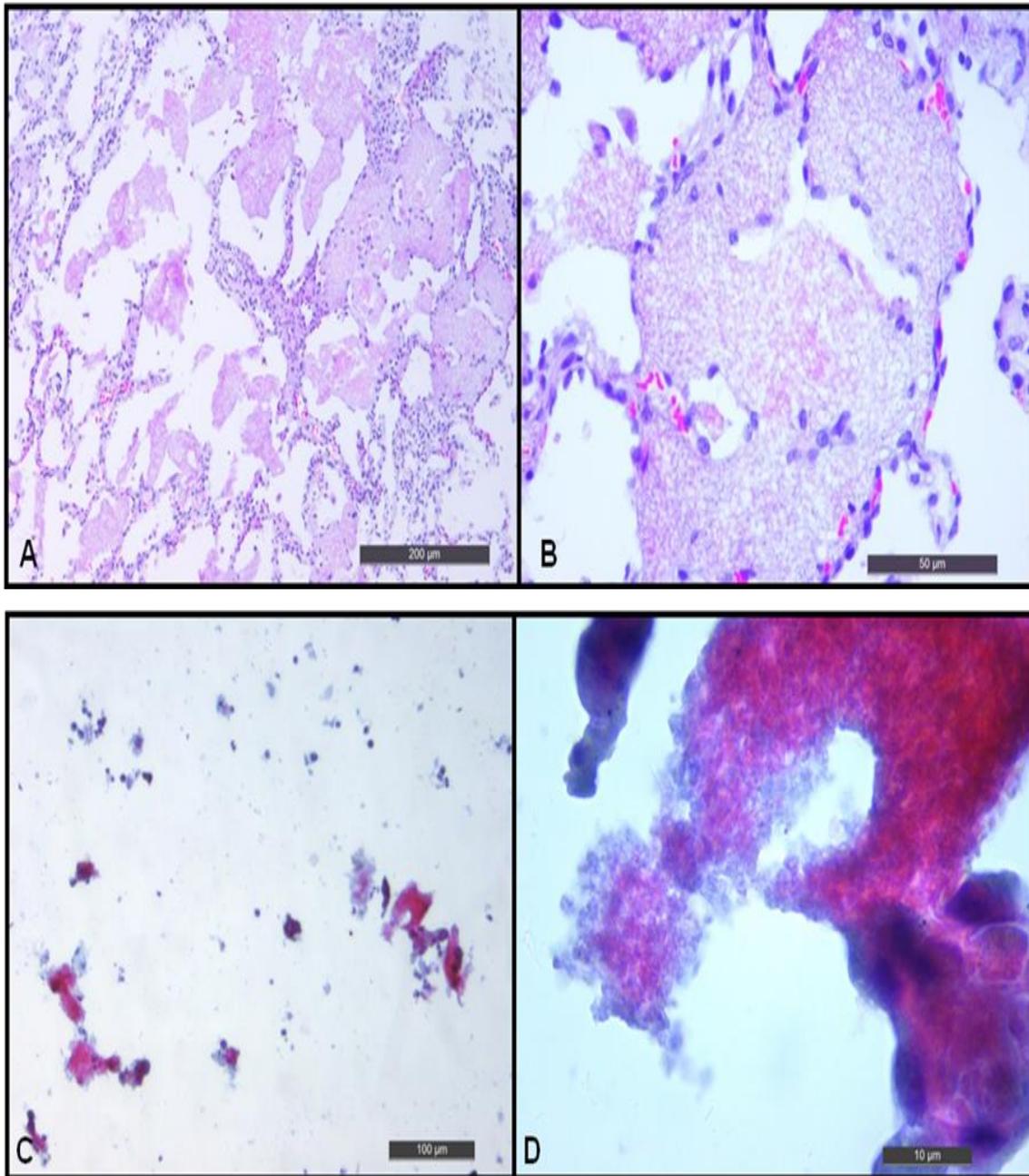
### 6.4. Métodos de diagnóstico morfológico de *Pneumocystis jirovecii*.

El diagnóstico se basa en el conocimiento y experiencia del citotecnólogo o el patólogo en la observación microscópica y puede ser simple y fácil en manos expertas; pero pueden presentarse inconvenientes para su interpretación.

La obtención y procesamiento del fluido pulmonar requiere conservar ciertas particularidades para una perceptiva evaluación como es, representar una muestra adecuada y con apropiada fijación. El material, que debe ser viable y suficiente, para ser aplicado con técnicas útiles y específicas como son: tinciones especiales (citoquímica), histoquímica (impregnación en parafina), técnicas inmunológicas (aplicación de anticuerpos por inmunofluorescencia (IF) o inmunocitoquímica (ICQ), microscopía electrónica de transmisión y biología molecular mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para apoyar el diagnóstico final.

Técnicas auxiliares al diagnóstico anatomopatológico:

- Microscopía fotónica con técnicas de baja complejidad o de rutina, con tinción dicromática basada con colorantes de hematoxilina y eosina (HE) y policromática con tinción de PAP que permiten distinguir los moldes proteináceos espumosos (exudado eosinófilo) producidos por Pj (Fig. 5).
- Microscopía fotónica de mediana complejidad con técnicas especiales: metenamina de plata de Gomori–Grocott, considerada el estándar de referencia para el diagnóstico de Pj y que tiñe la pared de las ascas de un color marrón oscuro a negro (Fig. 6). Tinciones de azul de toluidina y Wright–Giemsa que resaltan las ascosporas y tanto el Diff–Quick (tinción rápida de Romanovsky) como el ácido periódico de Schiff (PAS, por sus siglas en inglés) que tiñen los moldes proteináceos espumosos (Figs. 7a y b).
- Microscopía óptica con técnicas de alta complejidad como la IF o la ICQ con aplicación de anticuerpos monoclonales y reveladores específicos (Figs. 7c y d).
- Microscopía electrónica de transmisión como elección para observar daños a nivel ultraestructural según el diagnóstico clínico presuntivo y el criterio patológico (Fig. 7e).
- Técnicas de biología molecular como la PCR, que es más sensitiva que la técnica fluorescente particularmente en muestras de esputo, aunque no distingue entre la colonización y una infección primaria (Getachew, 2007; Piana, 2012).



**Figura 5. Tejido y células pulmonares con cambios morfológicos por la presencia de *Pneumocystis jirovecii* reveladas con tinciones convencionales.**

**A) Biopsia de parénquima pulmonar en vista panorámica que exhibe alveolos ocupados por múltiples moldes de material proteináceo espumoso acompañado de infiltrado inflamatorio (HE, 10x)**

**B) Acercamiento de espacios alveolares completamente invadidos por el exudado característico (HE, 40x)**

**C) Citología de lavado bronquial con datos de desprendimiento de moldes proteináceos espumosos, detritus celulares e infiltrado inflamatorio acompañante (PAP, 10x)**

**D) Detalle de un molde proteináceo espumoso que define sutiles formas esféricas sugerentes de la presencia de ascas (PAP, 100x)**

**Fotografías: Leica DMLS, Anatomía Patológica. INER**

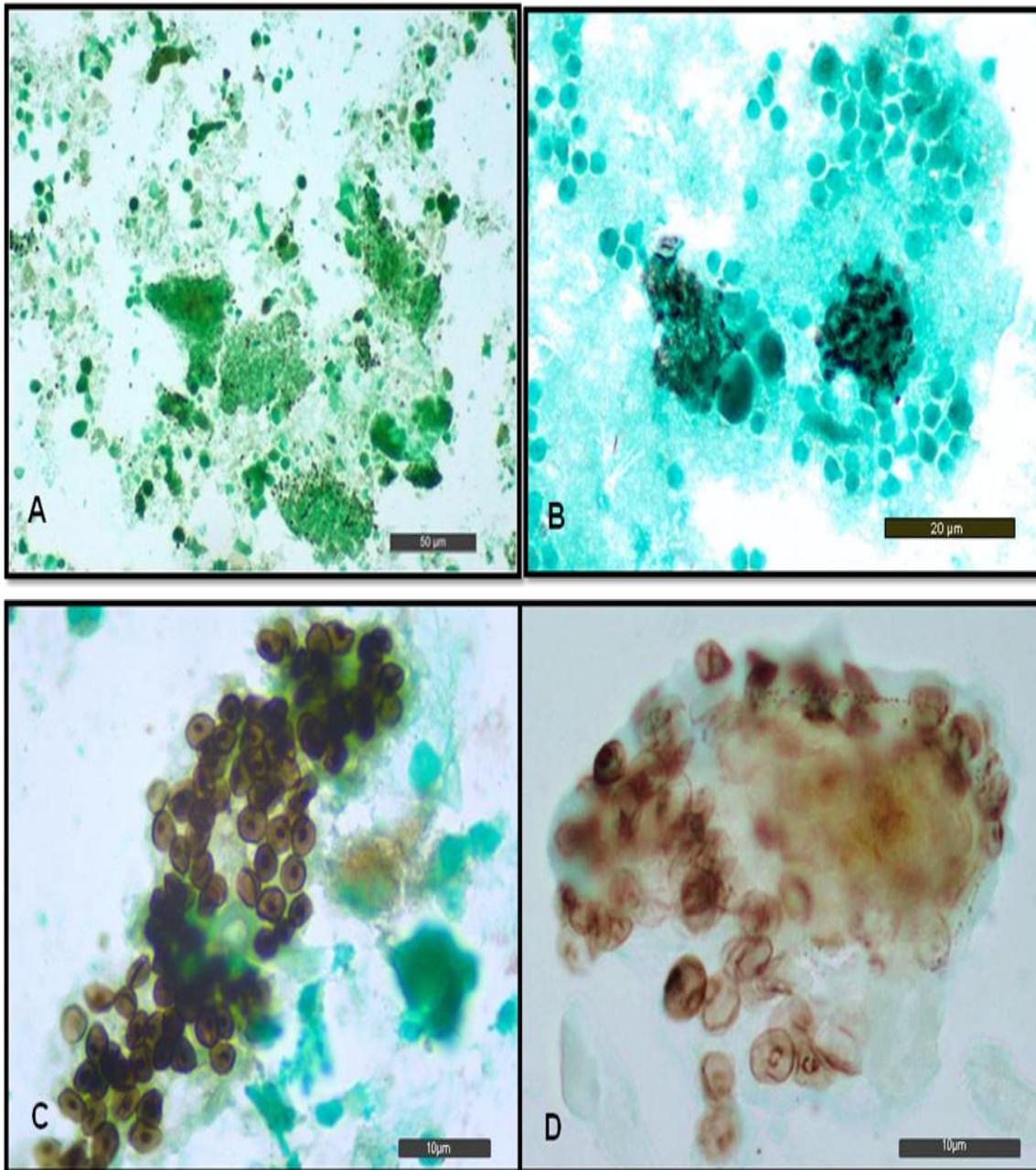


Figura 6. Citología de lavado bronquial con presencia de ascas y ascosporas de *Pneumocystis jirovecii* teñidas con metenamina de plata de Grocott modificado.

A) Vista panorámica con múltiples moldes de material espumoso en los que se distinguen ascas a manera de pequeños puntos de color café o negros y en el fondo macrófagos, células bronquiales y detritus celulares contrastados con verde brillante (10x)

B) Grupos de ascas orientadas sobre el exudado característico y acompañados de abundantes macrófagos y material proteináceo que se ha contrastado con verde brillante (20x)

C y D) Detalle morfológico de las ascas, la mayoría conteniendo ascosporas. La pared celular se evidencia dependiendo de su afinidad a la precipitación de la plata produciendo diferentes tonos (100x)

Fotografías: A y C, Leica DMLS; B y D, Carl Zeiss Axioskop Anatomía Patológica. INER

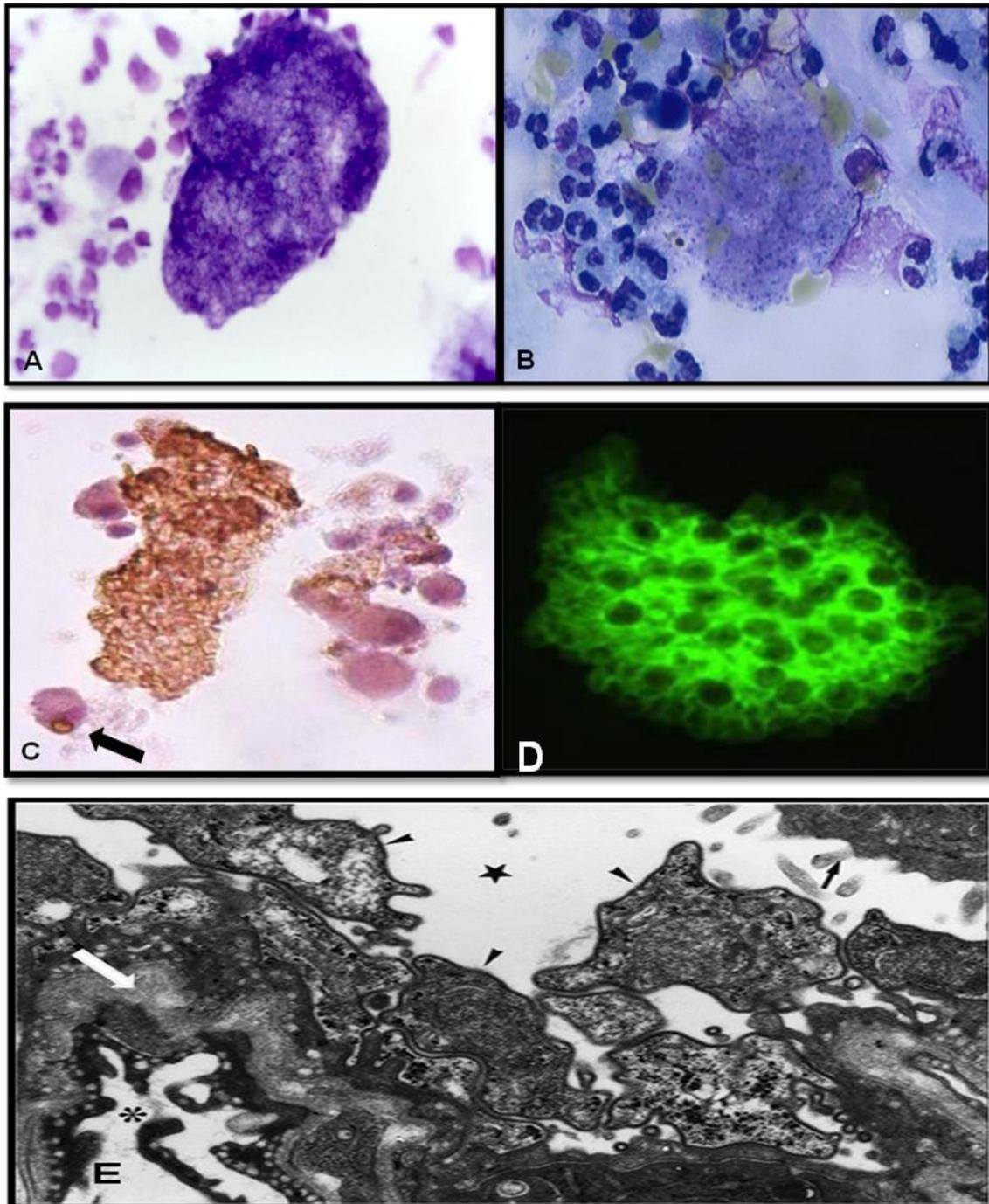


Figura 7. Métodos de diagnóstico morfológico para identificar *Pneumocystis jirovecii* en lavado bronquial.

A) Molde proteináceo teñido con Diff-Quick

B) Ascosporas resaltadas con colorante de Giemsa

C) Inmunoperoxidasa con anticuerpo monoclonal para *Pneumocystis carinii* que distingue paredes y fragmentos de ascas. Se aprecia un macrófago que ha fagocitado un ascas (flecha)

D) Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal contra Pj resaltando ascas

E) Ultraestructura con formas tróficas (puntas de flecha), lumen alveolar (estrella), microvellosidades de neumocitos tipo II (flechas pequeñas), membrana basal (flecha blanca) y lumen capilar (asterisco). Microscopía electrónica de transmisión de alta osmolaridad (700 mOsm) x24000

Fotografías: A, Medscape 2012; B, Web Path 2012; C, modificado de Vázquez *et al.*, 2008; D, DPDx 2012 y E, modificado de Dei-Cas, 1998.

## VII. MARCO TEÓRICO

El INER, ubicado en la República Mexicana es un organismo descentralizado del gobierno federal que tiene como misión mejorar la salud respiratoria de los individuos y comunidades a través de la investigación, la formación de recursos humanos y la atención médica especializada (INER, 2012). Apoyando con el cumplimiento de la visión del Instituto, el servicio de Anatomía Patológica participa activamente en la enseñanza de la patología respiratoria, colabora con otros centros especializados de salud como son el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) y el Instituto Nacional de Pediatría (INP), realiza diversos proyectos de investigación y desarrolla implementos e innovaciones en sus técnicas metodológicas.

Entre los objetivos del servicio de Anatomía Patológica (AP) como laboratorio de diagnóstico, se encuentra el análisis del material pulmonar para describir agentes infecciosos pulmonares, neoplasias, co-factores exógenos, complicaciones y hallazgos que definen diversas patologías en la población de pacientes que acuden al instituto. Dentro de sus actividades, se encuentra el apoyo asistencial al Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas (CIENI), que atiende, diagnostica, proporciona tratamientos y pronósticos a personas que presentan infecciones pulmonares secundarias a la infección por el VIH (CIENI, 2012). Este proceso es multidisciplinario y participan además diversas áreas del Instituto como: Consulta Externa, la Unidad de Urgencias Respiratorias, el Servicio Clínico 4 (especializado en la hospitalización de pacientes infectados con el VIH y complicaciones respiratorias), Epidemiología Clínica, Broncoscopía y Endoscopía, Análisis Clínicos, Imagenología y Microbiología.

## VIII. JUSTIFICACIÓN

El notable incremento de patógenos oportunistas en el hombre y los procesos de resistencia a determinadas terapias, requieren el conocimiento de sus semejanzas con los diversos organismos, las interacciones y los patrones comunes que producen en las neumonías. *Pneumocystis jirovecii* ha pasado de ser un organismo inocuo, a un patógeno mortal a partir de la prevalencia del VIH/SIDA. Las investigaciones en los últimos años, han descubierto las características que explican el hecho de haberlo clasificado en diversos grupos taxonómicos y los estudios moleculares han esclarecido su origen. En la actualidad, la instalación del TARA ha transformado la incidencia, etiología y pronóstico. La gran frecuencia que se observa en la actualidad, la falta de detección oportuna y la falla en el apego al tratamiento por parte del huésped, impide monitorear el daño posible. Se requiere valorar los métodos de detección y diagnóstico tomando en cuenta a Pj como un organismo co-evolutivo y en constante interacción con el humano.

El principal interés del presente estudio se dirige al diagnóstico citológico de Pj que se realiza en individuos con inmunodeficiencia, ya que su presencia indica la instalación del VIH y su diagnóstico se considera de gran valor, tomando en cuenta el obstáculo que representa la dificultad de su cultivo para la determinación estructural y por tanto, para la respuesta a antimicrobianos.

La extensa práctica realizada durante varios años en la detección citológica y la elevada frecuencia de pacientes con historias clínicas de inmunosupresión asociadas a complicaciones pulmonares, aportan la experiencia necesaria para implementar una apropiada metodología de diagnóstico para el Laboratorio de Citología aprovechando la infraestructura disponible dentro del servicio de AP.

Al evaluar las técnicas existentes y los beneficios de los métodos actuales destinados para su identificación, el Laboratorio de Citología podrá sugerir las modificaciones pertinentes en la metodología de diagnóstico necesarias para desarrollar mayor eficiencia, certeza y rapidez de detección; apoyando así, el diagnóstico y manejo terapéutico integral en nuestro medio hospitalario, haciéndolo extenso a otros Laboratorios en México.

## IX. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

Describir la experiencia en el diagnóstico citológico para *Pneumocystis jirovecii* realizado a pacientes con sospecha y VIH confirmado, por el Laboratorio de Citología en el servicio de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en la Ciudad de México durante el periodo de 2001 a 2010.

#### 1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Realizar un perfil demográfico de la población de pacientes con sospecha y VIH confirmado, mediante la revisión de los reportes existentes en el servicio de AP durante el periodo 2001 a 2010. Las variables consideradas son: edad, sexo, tipo de estudio patológico, tipo de muestra, año de consulta, diagnóstico clínico y diagnóstico patológico.

b. Describir las muestras que se realizaron a pacientes con sospecha y VIH confirmado basado en el tipo de estudio patológico (citológico e histológico), tipo de muestra (EXP, LB, CB, BAAF y Bx), sus frecuencias y el número de estudios por paciente implicados en la investigación patológica para obtener el diagnóstico definitivo.

c. Definir el número y tipo de estudios citológicos e histológicos que presentaron el diagnóstico preciso de Pj.

d. Determinar la concordancia considerando el índice de Kappa de Cohen, para los diagnósticos clínico y patológico (citológico e histológico), que especifiquen la presencia de Pj.

e. Establecer criterios para evaluar los atributos de calidad de las muestras citológicas e histológicas recibidas, con respaldo en el diagnóstico patológico realizado en el servicio de AP del INER.

## X. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

### 1. TIPO DE ESTUDIO

Este estudio se consideró retrospectivo, observacional, descriptivo y analítico.

Características de la población sujeta a estudio.

#### 1.1. Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico clínico con sospecha y VIH confirmado que cuenten con muestras citológicas pulmonares referidas al servicio de AP.

Pacientes con diagnóstico clínico con sospecha y VIH confirmado que cuenten con muestra histológica pulmonar de toma simultánea a muestras citológicas pulmonares referidas al servicio de AP.

Pacientes con diagnóstico clínico definido o con sospecha de Pj, sK ó neumonía atípica con muestras citológicas pulmonares referidas al servicio de AP.

Pacientes con diagnóstico clínico definido o con sospecha de Pj, sK ó neumonía atípica con muestra histológica pulmonar de toma simultánea a muestras citológicas pulmonares referidas al servicio de AP.

Pacientes registrados entre enero de 2001 y diciembre del 2010 en el servicio de AP.

#### 1.2. Criterios de Exclusión

Pacientes con diagnóstico clínico con sospecha o VIH confirmado sin muestra citológica pulmonar.

Pacientes con diagnóstico clínico con sospecha o VIH confirmado con muestra histológica pulmonar que no correlacione con muestras citológicas.

Pacientes con diagnóstico de inmunosupresión por etiología no asociada al VIH.

### 1.3. Criterios de Eliminación

Estudios con diagnóstico clínico referido en criterios de inclusión y que no cuenten con diagnóstico final.

### 1.4. Definición de unidades operacionales:

Para la apropiada interpretación, se definieron los siguientes conceptos de forma específica:

Diagnóstico clínico- Procedimiento por el cual se identificó una enfermedad, entidad nosológica, síndrome o cualquier condición de salud mediante la exclusión de otras posibles causas que presenten un cuadro clínico semejante al que el paciente padece.

Diagnóstico patológico - Procedimiento por el cual se identificaron los cambios estructurales bioquímicos y funcionales que subyacen a la enfermedad en células y tejidos mediante la observación morfológica de muestras de lesiones, principalmente a través de la microscopía fotónica con apoyo de diversos tipos de tinciones.

Estudio citológico – Conjunto de procesos de obtención, preparación y descripción de cualquier muestra celular para su investigación e interpretación.

Estudio histológico – Conjunto de procesos de obtención, preparación y descripción de cualquier muestra de tejido para su investigación e interpretación.

Muestra citológica pulmonar – Espécimen celular obtenido por los siguientes métodos y depositado en solución fijadora o sobre portaobjetos (EXP, LB, CB, BAAF).

Muestra histológica pulmonar (Bx) – Fragmento de tejido obtenido por microcorte y depositado en solución de formol.

## 2. DISEÑO DE LA INFORMACIÓN

Se revisaron en forma retrospectiva los reportes del archivo del servicio de AP de pacientes con sospecha y VIH confirmado que acudieron al INER por alguna afección respiratoria. Los datos se obtuvieron de los libros de registro del servicio entre el periodo de enero de 2001 hasta diciembre de 2010. Se consideraron todos los estudios citológicos e histológicos colectados conjuntamente a la toma con los criterios

de inclusión descritos y pertenecientes al mismo paciente. Las variables de análisis incluyeron: el nombre del paciente (guardando el anonimato de los pacientes incluidos), edad, sexo, folio de registro anual de los estudios, tipo de estudio (citológico e histológico), tipo de muestra (EXP, LB, CB, Bx y BAAF), diagnóstico clínico y diagnóstico patológico, ver Anexo 1. Estos últimos fueron agrupados en términos comunes basados con la Clasificación Internacional de Enfermedades de la OMS (CIE-10) y la experiencia del servicio de AP, ver Anexo 2. Se realizó una base de datos en hoja de cálculo Excel Microsoft Office 2007 que se procesó en programa SPSS versión 15.0.

Se estimó el número de pacientes y la prevalencia en sexo y edad. Se precisó el número total de estudios, el número de estudios realizados por paciente, el número total de muestras; y de ellas, las que contaron con diagnóstico patológico específico para Pj.

### 3. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EMPLEADAS PARA *Pneumocystis jirovecii*

Se recibieron en el servicio de AP las muestras citológicas e histológicas provenientes de diferentes servicios: Clínico, Urgencias, Imagenología, Broncoscopia y Quirófano del CIENI. La obtención del LB, CB y Bx pulmonar se realizó por medio de FBC. La BAAF fue apoyada por USG o TAC y finalmente la EXP el método no invasivo, fue colectada por esputos de cinco días consecutivos obtenidos por expectoración espontánea del paciente. Inmediatamente a la toma se fijaron las muestras; las líquidas (LB y EXP) con solución de Carbowax, (solución de fijación de Saccomanno que se elabora en el Laboratorio de Citología y proporciona para la disposición de muestras líquidas) ver Anexo 3.; y con etanol, el material depositado en las laminillas provenientes del CB y BAAF. El material de las Bx fueron fijadas en formol. Todas las muestras fueron referidas con solicitud impresa al servicio de AP.

El Laboratorio de Citología se ocupó de centrifugar las muestras de LB y EXP para obtener frotis representativos a partir del botón celular. Se rotularon las laminillas junto con las de CB y BAAF y procedieron a la tinción de PAP. Las Bx se procesaron en el Laboratorio de Histología por método de inclusión en parafina, corte de bloque y tinción de HE, ver Anexo 4.

En las biopsias con sospecha o confirmación de infección por el VIH y dependiendo del motivo de búsqueda de microorganismos, se agregaron tinciones tales como:

Grocott modificado y PAS ver Anexo 4, Ziehl Nielsen (ZN), Gram, Mucicarmín de Mayers y Wharting Starry; mientras que en los citológicos se aplicaron específica y simultáneamente, las tinciones de Grocott modificado y ZN como parte de un protocolo incluido para el LB y EXP. En los casos de CB y BAAF, solo cuando existió la sospecha.

Con base en la historia clínica del paciente y la descripción de las anomalías pulmonares referidas en la solicitud del estudio, se observó el contexto citológico e histológico en cada muestra bajo microscopios fotónicos Carl Zeiss Axioskop 40 y Leica DMLS con aumentos de 10 y 40X y según los criterios de calidad de cada muestra (descrita como adecuación en el apartado 5 de esta sección) se buscó identificar el material proteináceo espumoso eosinófilo o anfófilo en las tinciones de rutina: PAP y HE. Estas características se complementaron con la observación de las tinciones de Grocott modificado y PAS para definir el diagnóstico para dicho ascomiceto. En el Cuadro 3 se describen los criterios utilizados en la observación de las tinciones de rutina y especiales para la definición del diagnóstico. La imagen de moldes proteináceos espumosos de coloración eosinófila (rosa a rojo) en PAP y HE, o anfófila (azul a verde azul) en PAP, pueden contribuir considerablemente a la descripción; sin embargo, es imperioso evidenciar ascas con o sin ascosporas del organismo con las tinciones especiales.

**Cuadro 3. Criterios de consideración en la observación microscópica para definir el diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* en muestras citológicas e histológicas. Modificado de Vázquez et al., 2008**

DIAGNOSTICO DE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	Tinción de Papanicolaou ó Hematoxilina – eosina. Presencia de moldes de material proteinaceo espumoso eosinófilo o anfófilo	Tinción de Grocott ó Pas. Presencia de ascas con o sin esporocitos.
PRESENCIA DE	+/-	+
SUGESTIVO DE	+	-
COMPATIBLE CON	+/-	Escasas ascas con hipo ó hipertinción
DESCRIPTIVO	+/-	Presencia de esporas e hifas no determinadas
DESCRIPTIVO	+/-	Presencia de esporas dentro de macrófagos con morfología compatible tanto a <i>Pneumocystis jirovecii</i> como a <i>Histoplasma aberrans</i>

#### 4. CONCORDANCIA CLÍNICO PATOLÓGICA

Para determinar el índice de concordancia, se utilizaron las descripciones de los diagnósticos clínico y patológico, agrupándolas por entidades comunes fundamentadas en la clasificación del CIE-10 de la OMS y en la experiencia del servicio de AP, ver Anexo 2 y el Cuadro 4. Considerando que para un mismo paciente, la sospecha clínica respiratoria fluctuó continuamente para diferentes entidades, las descripciones se evaluaron con criterios de: ausencia (0), presencia (1) y probable presencia (2). Se estimó el índice de Kappa de Cohen, con márgenes propuestos por Byrt, (Dawson y Trapp, 2001; Szklo y Nieto, 2003) para el criterio específico de Pj en la solicitud clínica y el diagnóstico patológico de Pj en cualquiera de las muestras. Las descripciones de “presencia” y “compatible” fueron incluidas en el criterio (1) y la descripción de “sugestivo” se consideró como criterio (2).

**Cuadro 4. Entidades etiológicas descritas en las variables de diagnóstico clínico y patológico.**

VIH	Virus de inmunodeficiencia humana	(Descrito sólo para diagnóstico clínico)
Pj	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	
Myc	Micobacterias	
Neo	Neoplasias	
Mic	Micosis	
Vir	Viral	
Bact	Bacterias	
NI	Neumopatía Intersticial	
Neu	Neumonía	
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	
AI	Alteraciones inflamatorias	(Descrito sólo para diagnóstico citopatológico)
S/Alt	Sin alteraciones	(Descrito sólo para diagnóstico citopatológico)
Otros		(Descrito sólo para diagnóstico citopatológico)

## 5. ATRIBUTOS DE CALIDAD PARA MUESTRAS CITOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS

En cuanto a la calidad de las muestras remitidas al servicio de AP se definieron características basadas en la descripción del diagnóstico patológico para cada muestra, ver Anexo 2; y se utilizaron las variables de adecuación y certeza descritas a continuación, Cuadro 5.

**Adecuación** – Presencia ó ausencia de células bronquiales o neumocitos y macrófagos en el caso de muestras citológicas y presencia de parénquima (alvéolos y bronquiólos) en las muestras histológicas.

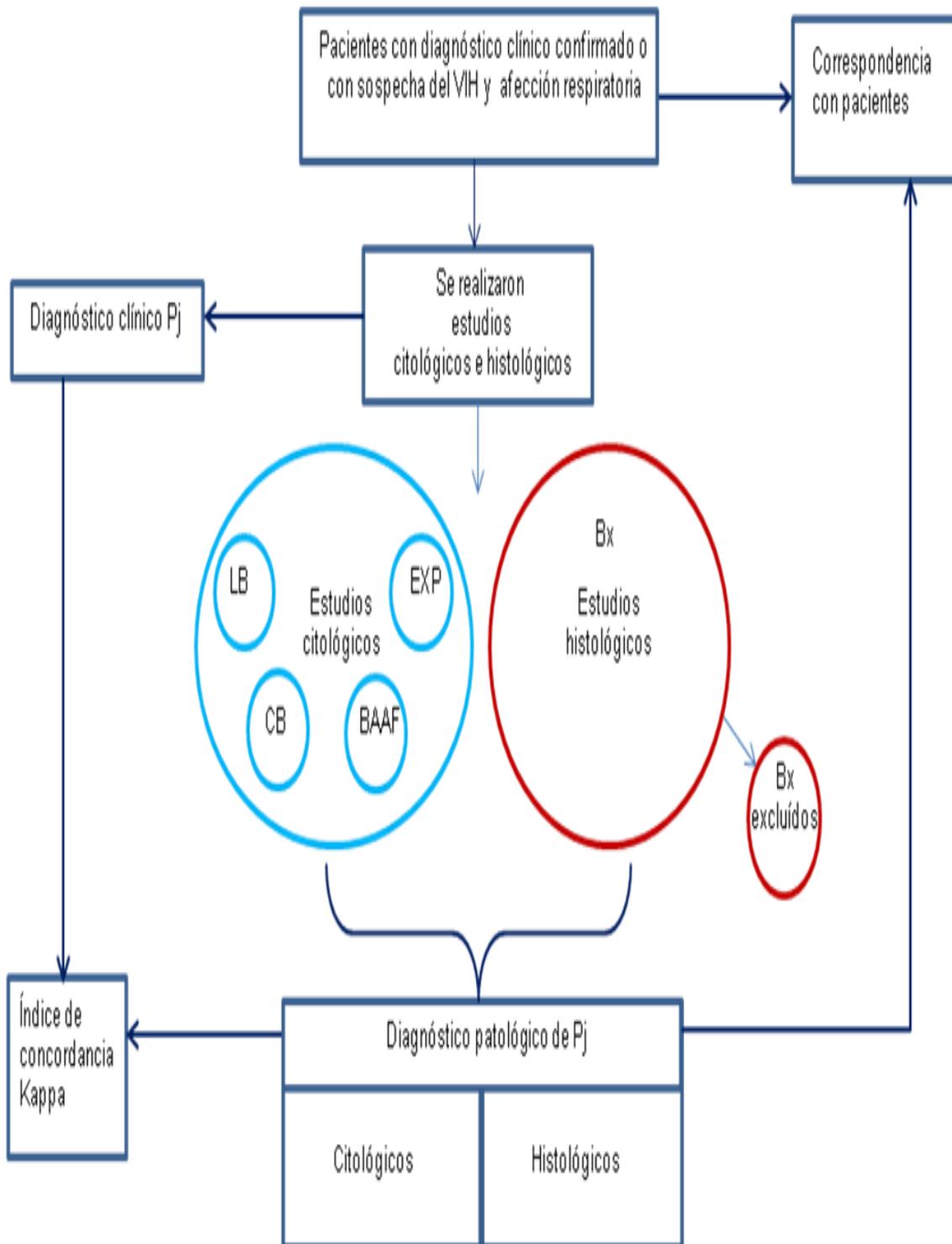
**Certeza** – Descripción citológica o histológica referido al diagnóstico de Pj; y dentro de este concepto:

- Específico. Descripción específica de “presencia de”, “compatible con” Pj o diagnóstico de neumocistosis.
- Inespecífico. Todos los diagnósticos que no describieron la presencia o compatibilidad

**Cuadro 5. Criterios de evaluación de calidad para las muestras citológicas e histológicas remitidas al servicio de Anatomía Patológica**

ADECUACIÓN	
Adecuado	Inadecuado
CERTEZA	
Específico para Pj	Inespecífico

En la Fig. 8, se resume la secuencia de análisis de los estudios, de las muestras citológicas e histológicas y de los diagnósticos de infección de Pj en la población de pacientes con sospecha y VIH confirmado con respecto al abordaje clínico y patológico.



**Figura 8. Secuencia de abordaje de casos de pacientes con sospecha y VIH confirmado ingresados en el INER para la búsqueda de *Pneumocystis jirovecii* por método patológico durante el periodo de 2001 a 2010 (EXP) Expectoración, (LB) Lavado bronquial, (CB) Cepillado bronquial, (BAAF) Biopsia por aspiración con aguja fina y (BX) Biopsia pulmonar**

## XI. RESULTADOS

Entre el periodo de enero de 2001 y diciembre de 2010, se revisaron en el servicio de AP, un total de 39,723 estudios citológicos e histológicos con distintas características y diversas patologías. De ellos, el 5.8 % correspondieron a 2 300 muestras realizadas a una población de 893 pacientes con diagnóstico clínico confirmado o con sospecha de infección por el VIH. Demográficamente correspondieron a 776 (87%) pacientes del sexo masculino y a 117 (13%) del sexo femenino. El ámbito de edad comprendió de 2 a 70 años para hombres con una media de 34.2 ( $\pm$  8.87) años y de 1 mes a 65 años para mujeres, con una media de 35 ( $\pm$  9.9) años. El diagnóstico de ingreso al instituto se explica en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Diagnóstico clínico de ingreso al INER en pacientes con sospecha y VIH confirmado durante el periodo de 2001 a 2010**

<b>Diagnóstico Clínico</b>	<b>N = 893</b>	<b>100 %</b>
<b>VIH</b>	<b>780</b>	<b>87.3</b>
<b>Pb VIH</b>	<b>56</b>	<b>6.3</b>
<b>Sospecha de Pneumocystis jirovecii, sarcoma de Kaposi, linfoma o neumonía atípica</b>	<b>57</b>	<b>6.4</b>

N= número total de pacientes, Pb = probable

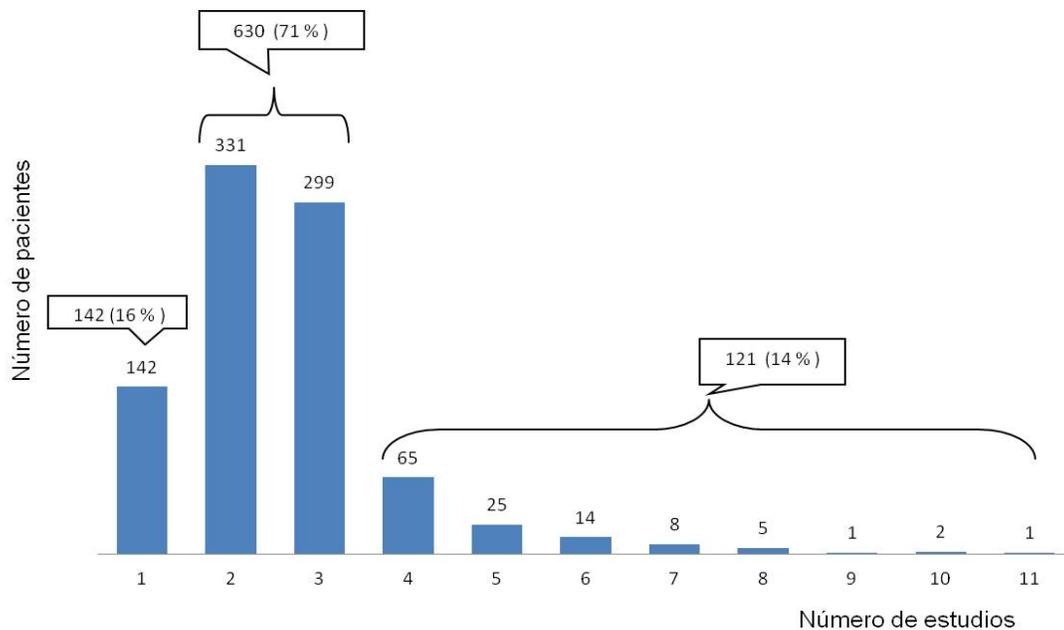
En los estudios referidos al servicio de AP se describieron diversas etiologías respiratorias; y en múltiples ocasiones, con más de un diagnóstico diferencial para una misma muestra. La principal búsqueda fue dirigida hacia las neumonías infecciosas producidas por Pj y las micobacterias, seguida por la reseña clínica de la condición del VIH sin precisar la etiología agregada. Las neumonías producidas por otras micosis, virus y bacterias, así como las neoplasias, fueron menos investigadas y se contempló una averiguación mínima para la neumopatía intersticial (NI) y el EPOC. En raras ocasiones se solicitó la exploración de otros parásitos específicos, ver Cuadro 7. Los datos detallan la cantidad de diagnósticos clínicos descritos tanto por paciente como por muestra y los porcentajes permiten percibir la dificultad que representa precisar el diagnóstico. Se considera que diagnosticar la NI, el EPOC o definir una neumonía en general, ocurre indiscutiblemente con mayor facilidad; y de forma contraria, es

complicado precisar al microorganismo causante de ésta última o definir clínicamente la presencia de alguna neoplasia. Los valores totales de 1290 y 3559 descritos al final del cuadro, corresponden al número de diagnósticos realizados por los médicos clínicos con el motivo de averiguar en la mayoría de los casos, más de una entidad patológica.

**Cuadro 7. Principales diagnósticos de patologías respiratorias asociadas a pacientes con sospecha y VIH confirmado en el INER durante el periodo de 2001 a 2010**

Diagnósticos clínicos de patologías respiratorias	Por paciente = 893			Por muestra = 2300		
	Confirmada	Probable	total	Confirmada	Probable	total
Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	213 45.4	256 54.5	469 %	591 47.6	651 52.4	1242 %
Neumonía por Micobacterias	90 30.1	209 69.9	299 %	272 31.2	600 65.8	872 %
Neumonía por otras micosis	30 30	70 70	100 %	101 31.8	216 68.1	317 %
Neumonía viral	5 22.7	17 77.3	22 %	24 26.6	66 73.3	90 %
Neumonía bacteriana	4 44.4	5 55.5	9 %	12 44.4	15 55.5	27 %
Neumonía por otros parásitos	2 100	0 0	2 %	5 100	0 0	5 %
Neumonía atípica	21 91.3	2 8.7	23 %	49 87.5	7 12.5	56 %
Neumonía inespecífica	82 88.2	11 11.8	93 %	248 86.7	38 13.2	286 %
Neumopatía intersticial	31 96.8	1 3.1	32 %	91 96.8	3 3.2	94 %
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	10 100	0 0	10 %	27 100	0 0	27 %
Neoplasias	33 34.7	62 65.2	95 %	114 39.1	177 60.8	291 %
Sin diagnóstico neumológico asociado	136 100	0 0	136 %	252 100	0 0	252 %
			1290			3559

Se realizó un análisis de los estudios recibidos en el servicio de AP para definir la cantidad de muestras realizada por paciente, los tipos y la proporción entre estos; lo cual precisó que se practicaron preferentemente de dos a tres estudios por paciente en 71% de la población. Se estimó que a 16% se le practicó un solo estudio y que realizar más de cuatro estudios a un paciente constituyó una práctica poco usual (Fig. 9).



**Figura 9. Distribución de frecuencia de estudios citológicos e histológicos realizados por paciente con diagnóstico clínico de sospecha y VIH confirmado referidos al servicio de Anatomía Patológica del INER durante el periodo de 2001 a 2010 (N = 893 pacientes)**

El Cuadro 8 describe los estudios y las muestras recibidas por año en el servicio de AP. Los valores reflejan que los clínicos solicitaron mayor número de estudios citológicos y que el LB es el tipo de muestra más requerida, con un incremento significativo en su frecuencia a partir de 2008. La Bx mostró un descenso entre 2004 y 2006; pero aún así, correspondió al segundo estudio más frecuente. Los CB incrementaron su frecuencia a partir del año 2007 y las EXP representan una muestra poco solicitada que mostró mayor exhibición en los años 2005 y 2006. Finalmente, las BAAF fueron limitadas para la valoración de este tipo de pacientes ya que, es a partir del año 2005 cuando se observó su práctica, siendo el año 2008 representativo de la mitad de todas las muestras registradas.

**Cuadro 8. Tipos de estudio y tipos de muestras solicitadas de pacientes con diagnóstico clínico de sospecha y VIH confirmado, registrados en el servicio de Anatomía Patológica durante el periodo de 2001 a 2010**

		2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
Tipo de estudio	Cx	57	112	91	85	169	162	175	282	197	320	1650
	Hx	33	68	75	22	10	24	87	105	85	141	650
		90	180	166	107	179	186	262	387	282	461	2300
Tipo de muestra	EXP	4	3	1	9	46	48	1	5	1	2	120
	LB	41	87	87	58	77	69	91	147	104	163	924
	CB	12	22	3	18	45	42	80	122	92	154	590
	BAAF	0	0	0	0	1	3	3	8	0	1	16
	Bx	33	68	75	22	10	24	87	105	85	141	650
(N)		90	180	166	107	179	186	262	387	282	461	2300

(Cx) citológico, (Hx) histológico, (EXP) expectoración, (LB) lavado bronquial, (CB) cepillado bronquial, (BAAF) biopsia por aspiración con aguja fina, (Bx) biopsia pulmonar y (N) total de muestras.

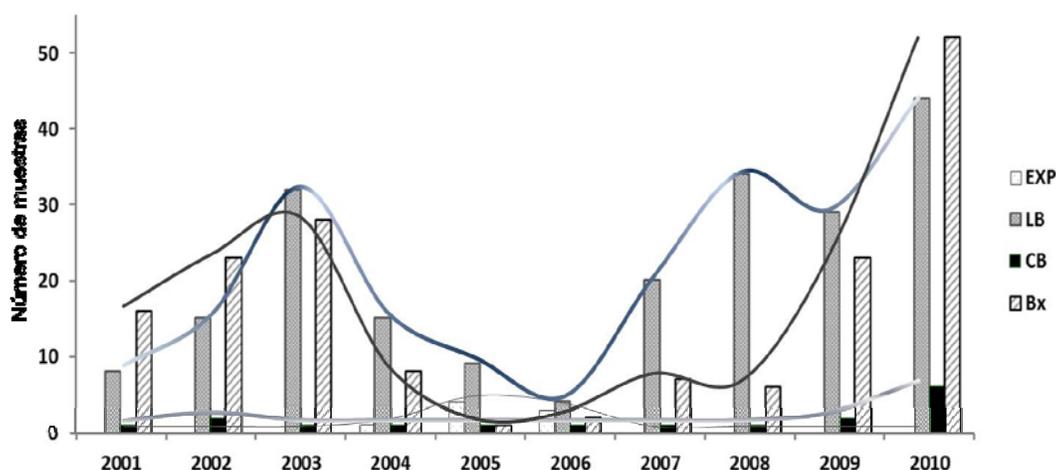
La exploración de las 2300 muestras por procedimiento patológico reconoció formas biológicas de Pj descritos como “presencia de” o “compatible con” en 401 (17%) de ellas. La evidencia se mostró en 235 muestras citológicas y 166 histológicas, y el diagnóstico se realizó con mayor frecuencia en el LB, ver Cuadro 9. Los diagnósticos correspondieron a 174 pacientes masculinos y a 19 pacientes femeninos

**Cuadro 9. Resultado diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* en muestras citológicas e histológicas de pacientes con sospecha y VIH confirmado estudiados en el INER durante el periodo de 2001 a 2010.**

Tipo de muestra	Número de muestras	Pj presente	Tipo de muestra %
LB	924	210	23
Bx	650	166	26
CB	590	17	3
EXP	120	8	7
BAAF	16	0	0
<b>Total</b>	<b>2300</b>	<b>401</b>	<b>17</b>

(N = 2300 muestras)

El comportamiento de Pj se aprecia con la detección en los diferentes tipos de muestras citológicas e histológicas y sus tendencias por año, ver Fig. 10. En el primer tercio de la década, se percibe un aumento constante que para el segundo tercio decae de forma importante y vuelve a elevar su presencia hacia los últimos años. Las muestras citológicas revelaron la detección de este hongo durante los diez años de estudio y las muestras histológicas mostraron mayor incidencia a inicios y finales de la década. El LB y la Bx representan las principales muestras en las que se definió el diagnóstico



**Figura 10. Detección y tendencia de *Pneumocystis jirovecii* en muestras citológicas e histológicas de pacientes con sospecha y VIH confirmado reportadas en el servicio de Anatomía Patológica del INER en el periodo 2001 - 2010. (N = 401)**

La muestra de CB demostró su presencia constante con muy baja frecuencia y la EXP mostró al organismo solo en el periodo de 2004 a 2006. La única muestra que no reportó su existencia fue la BAAF.

En 36 (1%) de las muestras revisadas, se identificó la asociación de Pj con otras entidades etiológicas pulmonares. La coinfección con virus ocurrió con CMV (n=14), herpes (n=1) y adenovirus (n=1); entre las micosis con géneros de *Candida* (n=3), *Aspergillus* (n=1), *Cryptococcus* (n=1) y formas fúngicas no determinadas (n=2). Con bacterias y micobacterias fueron demostradas por coloración y en dos ocasiones más con una tercera asociación, ver Cuadro 10.

**Cuadro 10. Asociación de *Pneumocystis jirovecii* con otros organismos y enfermedades respiratorias**

<b>Patologías asociadas con <i>Pneumocystis jirovecii</i></b>	<b>Muestras (N°)</b>
<b>Virales</b>	<b>16</b>
<b>Micobacterias</b>	<b>7</b>
<b>Otras micosis</b>	<b>7</b>
<b>Bacterianas</b>	<b>3</b>
<b>EPOC</b>	<b>1</b>
<b>Virales y EPOC</b>	<b>1</b>
<b>Virales y bacterianas</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>36</b>

Para evaluar la correlación entre los diagnósticos clínico y patológico de Pj, se calculó el índice de Kappa de Cohen, con márgenes propuestos por Byrt, (Dawson y Trapp, 2001; Szklo y Nieto, 2003). La concordancia coincidió para 24 % de las 591 muestras que refirieron el diagnóstico clínico de neumocistosis obteniéndose una  $k = 0.75$ , ver Anexo 5. En los estudios con descripción clínica de “probable presencia de Pj” se demostró en 25 % de las muestras por método patológico y para aquellos estudios que en el diagnóstico clínico lo excluyeron, el organismo fue demostrado en 9 % de las muestras citológicas e histológicas, ver Cuadro 11.

**Cuadro 11. Concordancia para Pj entre el diagnóstico clínico y patológico de muestras realizadas a pacientes con sospecha y VIH confirmado durante el periodo de 2001 a 2010 en el INER**

Tipo de muestra	Dx cli de ausencia de Pj	Dx pat de Pj	Dx cli de presencia de Pj	Dx pat de Pj	Dx cli de probable presencia de Pj	Dx pat de Pj
EXP	48	0	34	3	38	5
LB	433	50	218	71	273	89
CB	277	2	157	8	156	7
BAAF	13	0	2	0	1	0
Bxpul	297	44	180	62	183	60
<b>N =</b>	<b>1058</b>	<b>96</b>	<b>591</b>	<b>144</b>	<b>651</b>	<b>161</b>
<b>%</b>		<b>9</b>		<b>24</b>		<b>25</b>
<b>k =</b>	-	-	-	<b>0.75</b>	-	-

(EXP) expectoración, (LB) lavado bronquial, (CB) cepillado bronquial, (BAAF) biopsia por aspiración con aguja fina y (Bx) biopsia pulmonar. (Dx cli) diagnóstico clínico, (Dx pat) diagnóstico cito-histológico, (Pj) *Pneumocystis jirovecii*, (k =) índice de concordancia, (N) número de muestras.

Como parte del estudio, se consideró importante evaluar la calidad de las muestras mediante la revisión del diagnóstico patológico. Se concretó que el 95 % de las muestras contaron con los componentes suficientes para realizar una valoración adecuada y dentro de éstas se obtuvo una certeza diagnóstica para Pj de 18 %, ver Cuadro 12.

**Cuadro 12. Evaluación de la calidad en muestras pulmonares con base al diagnóstico emitido en el servicio de Anatomía Patológica de pacientes con sospecha y VIH confirmado, recibidas durante el periodo de 2001 a 2010 en el INER**

<b>ADECUACIÓN</b>	
Adecuado 2185 (95 %)	Inadecuado 115 (5 %)
<b>CERTEZA</b>	
Específico para Pj 401 (18 %)	Irrespecífico 1784 (82 %)

(N = 2300 muestras)

El resto de las muestras adecuadas, recibieron diagnósticos inespecíficos (82 %), con descripciones principalmente de inflamación inespecífica y en menor proporción con otras entidades patológicas específicas. Cabe mencionar que 52 muestras contaron con datos sugerentes de Pj al percibir en la observación microscópica de la tinción de rutina, contextos relacionados; sin embargo, no fue posible demostrar su presencia por medio de las tinciones especiales. Por este motivo, se describieron como “sugestivas” y se consideraron dentro de diagnósticos inespecíficos, ver Cuadro 13.

**Cuadro 13. Diagnósticos patológicos de muestras consideradas adecuadas por la evaluación de calidad con certeza inespecífica para *Pneumocystis jirovecii***

<b>Diagnóstico patológico</b>	<b>Muestras (Nº)</b>
<b>Probable presencia de Pj</b>	<b>52</b>
<b>Micobacterias</b>	<b>81</b>
<b>Neoplasias</b>	<b>23</b>
<b>Otras micosis</b>	<b>71</b>
<b>Virales</b>	<b>19</b>
<b>Bacterias</b>	<b>23</b>
<b>Otros parásitos</b>	<b>3</b>
<b>Neumopatía intersticial</b>	<b>7</b>
<b>Neumonías</b>	<b>32</b>
<b>Enfisema Pulmonar Obstructivo Crónico</b>	<b>15</b>
<b>Alteraciones Inflammatorias inespecíficas</b>	<b>1358</b>
<b>Sin alteraciones</b>	<b>92</b>

(N = 1784 muestras)

El 5 % de todas las muestras resultaron inadecuadas en la evaluación de la calidad; la descripción detallada se muestra en el Cuadro 14. El LB y el CB reflejaron valores bajos, mientras que la Bx aumentó en porcentaje. La BAAF representó el procedimiento con mayor complicación para obtener una muestra representativa al presentar el mayor porcentaje de muestras inadecuadas, mientras que la EXP ofreció constantemente material celular distintivo de pulmón.

**Cuadro 14. Descripción del diagnóstico de muestras consideradas como inadecuadas por la evaluación de calidad realizadas a pacientes con sospecha y VIH confirmado, revisadas en el periodo de 2001 a 2010 en el servicio de Anatomía patológica del INER**

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Total realizadas</b>	<b>Inadecuadas</b>	<b>Tipo de muestra %</b>
<b>LB</b>	<b>924</b>	<b>21</b>	<b>2.3</b>
<b>Bx</b>	<b>650</b>	<b>58</b>	<b>9</b>
<b>CB</b>	<b>590</b>	<b>29</b>	<b>5</b>
<b>EXP</b>	<b>120</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>BAAF</b>	<b>16</b>	<b>6</b>	<b>37.5</b>
<b>Total</b>	<b>2300</b>	<b>115</b>	<b>5</b>

(N = 2300 muestras)

El análisis de las muestras inadecuadas evaluadas por año y por tipo de muestra definieron un incremento hacia los últimos años, distinguiendo a partir de 2007 mayor frecuencia para las Bx y en 2010 para los CB, ver Cuadro 15.

**Cuadro 15. Descripción por año y tipo de estudio de muestras consideradas inadecuadas por la evaluación de calidad realizadas a pacientes con sospecha y VIH confirmado, revisadas en el periodo de 2001 a 2010 en el servicio de Anatomía Patológica del INER**

<b>Año / Tipo de muestra</b>	<b>Número de muestras Inadecuadas</b>					<b>Total</b>
	<b>EXP</b>	<b>LB</b>	<b>CB</b>	<b>BAAF</b>	<b>Bx</b>	
<b>2001</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>2002</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>2003</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>2004</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>2005</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
<b>2006</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>2007</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>22</b>
<b>2008</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>17</b>
<b>2009</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>23</b>
<b>2010</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>29</b>
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>21</b>	<b>29</b>	<b>6</b>	<b>58</b>	<b>115</b>

N = 115 muestras

La Figura 11, resume los resultados obtenidos del análisis los estudios, de las muestras citológicas e histológicas y de los diagnósticos de infección de Pj en la población de pacientes con sospecha y VIH confirmado con respecto al abordaje clínico y patológico.

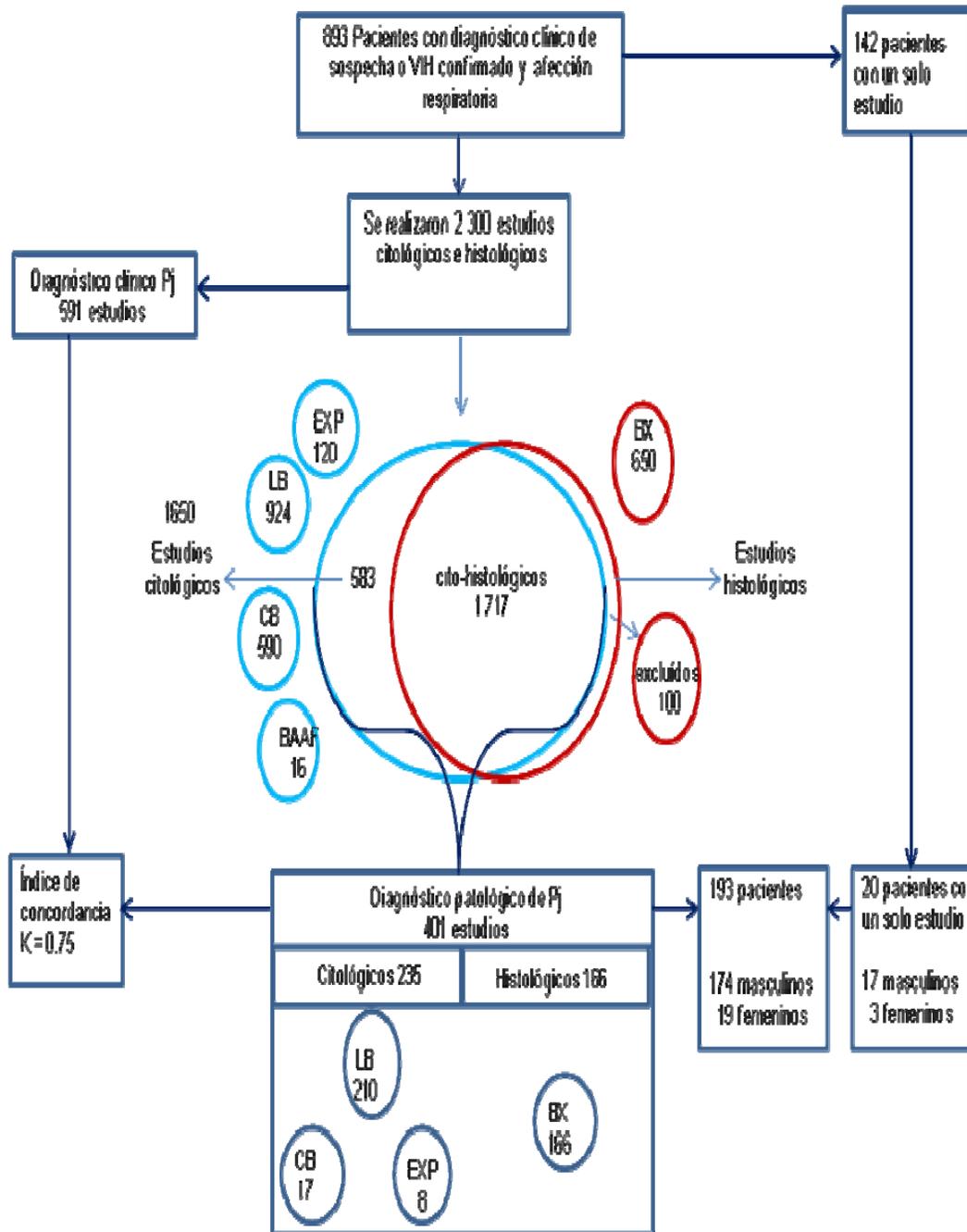


Figura 11. Resultado de la secuencia de abordaje de casos de pacientes con sospecha y VIH confirmado ingresados al INER para la búsqueda de *Pneumocystis jirovecii* por método patológico durante el periodo de 2001 a 2010 (EXP) Expectoración, (LB) Lavado bronquial, (CB) Cepillado bronquial, (BAAF) Biopsia por aspiración con aguja fina y (BX) Biopsia pulmonar

## XII. DISCUSIÓN

El servicio de Anatomía Patológica participa activamente en la investigación de las enfermedades pulmonares y una actividad sustancial, consiste en realizar diagnósticos basados en las alteraciones morfológicas, celulares y tisulares así como de agentes infecciosos pulmonares, neoplasias, complicaciones y hallazgos, apoyado por la aplicación de diversas técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas para concretar un diagnóstico definitivo. Dentro del servicio, el Laboratorio de Citología se basa en la aplicación de algunas de estas técnicas y la implementación de procedimientos de conservación celular, obteniendo mayor aprovechamiento de las muestras para ofrecer un diagnóstico rápido, preciso y confiable a los pacientes que acuden al INER de la Ciudad de México y puedan recibir tratamientos oportunos.

Para analizar el perfil de la población examinada, consideramos conveniente revisar el estudio de Del Campo-Rodríguez y Sifuentes-Osornio (2004). Su trabajo se basó en la comparación de siete series de corte epidemiológico con diagnóstico de SIDA, realizadas en México en las últimas décadas. Dos de ellas, reportaron poblaciones similares a los incluidos en este trabajo y en periodos de tiempo similares. 909 y 1182 pacientes respectivamente, representan los datos descritos por Villasís *et al.* 2001, en el periodo de 1984 a 1995 y por García-Sancho *et al.* 2003, entre el periodo de 1991 a 2001 (éste último, realizado en el INER). Ambos autores revelaron porcentajes de infección de 87/13 para el VIH con predominio de pacientes masculinos; valores que coinciden con los observados en este análisis. Ellos refirieron edades promedio de 35.1 (ámbito de 14 a 81) y entre 25 y 45 (ámbito de 15 a 83) respectivamente. Al compararlos con los valores de 34.2 (ámbito de 2 a 70) para hombres y 35 (ámbito de 1 mes a 65) para mujeres en el presente estudio, se percibe una ligera disminución en la edad promedio del sexo masculino. Es necesario considerar varios factores en la actual población ya que el ámbito de edades fue más amplio, los valores de edad promedio se realizaron por sexo, y además se consideraron tanto a pacientes pediátricos como pacientes con sospecha diagnóstica para el VIH. Creemos que estos grupos son significativos para incluir en el perfil epidemiológico.

Conjuntamente al tipo de pacientes ya mencionados, se tomaron en cuenta aquellos que detallaron diagnósticos clínicos para Pj y sK, que son enfermedades indicadoras de infección por el VIH, aún sin que ésta última haya sido confirmada por serología. Por otra parte, Cordero *et al.* documentan en 2003 que los linfomas pueden o no estar asociados al VIH y en su análisis los definen como la segunda neoplasia más frecuente en dichos pacientes; por dicho motivo formaron parte de la población de estudio, permitiendo así la probabilidad de detección de Pj en coexistencia con esta neoplasia independientemente del grado de inmunosupresión. En cuanto a la neumonía atípica, la orientación diagnóstica de los síntomas en gran medida es obstaculizada por la similitud clínica que puede presentar con otras patologías o con el gran polimorfismo que expresa la misma enfermedad. La etiología más frecuente documentada ocurre por infección bacteriana, pero la neumonía por Pj, Tb y otras micosis son incluidas entre los posibles diagnósticos diferenciales para esta entidad (Kumar y Cotran, 2003).

La NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-010-SSA2-1993 define a cualquier diagnóstico patológico comprobado por microscopía, por cultivo o de manera presuntiva y los estima como criterios suficientes para establecer el diagnóstico del SIDA aún sin evidencia de serología de infección por el VIH. De carácter análogo, la clasificación de infección por el VIH propuesta por la CDC desde 1993, incluye como casos del SIDA a todos los pacientes que cuenten con niveles de células CD+4 inferiores a 200 céls./mm<sup>3</sup> aunque no presenten manifestaciones clínicas indicadoras (Piana, 2012). En los datos del Cuadro 6., se describen 57 pacientes (6.5 % de la población de estudio) que cumplieron con éstas condiciones al definir diagnósticos clínicos de sospecha ya sea de Pj, sK, linfoma o neumonía atípica sin evidencia concreta del VIH; de los cuales es relevante mencionar que 15 de ellos presentaron neumonía por Pj.

El análisis de los estudios referidos al servicio de AP, definió que a un porcentaje alto de la población, se les realizaron en promedio de dos a tres estudios por paciente y resaltan datos de pacientes que fueron valorados con un solo estudio; de tipo citológico (142 ocasiones /16 %), ver Fig. 9., y de tipo histológico (100 casos, contemplados como criterios de exclusión). Estos hallazgos aportan las bases para sostener que la elección por la práctica citológica fue más conveniente en este tipo de investigaciones diagnósticas. Además, la existencia de muestras únicas se traduce como la imposibilidad de realizar estudios completos (LB, CB, Bx y EXP) esencialmente por la existencia de complicaciones ya sea al inicio o durante el procedimiento broncoscópico, por inaccesibilidad al sitio de interés, contraindicación

médica, rechazo y abandono por parte del paciente a la atención médica o por su fallecimiento. Otra referencia importante resultó en los casos que se repitieron estudios a tiempos distantes desde 4 y hasta por 11 ocasiones en el 14 % de la población con lo que se demuestra, que el método patológico resulta ser el procedimiento de elección para dar seguimiento y monitoreo de la efectividad del tratamiento o bien para revalorar la evolución de la enfermedad. El mayor número de muestras registradas en el servicio de AP provino del servicio de Broncoscopía y se percibió que por cada 10 LB practicados, se realizaron 7 Bx y 6 CB. Aun así, en el INER se efectúa una cantidad considerable de biopsias pulmonares con buenos resultados como lo refieren Vega y Reyes (2005), que puntualizan en la sensibilidad diagnóstica para el LB en 86 %, para la Bx en 87 % y para ambos procedimientos en 100 %.

La proporción aproximada de estudios citológicos e histológicos realizados fue de 2:1 con un aumento constante para los citológicos durante todo el periodo percibiendo una ligera disminución en los años 2003 y 2004 y para los estudios histológicos una práctica menor con una baja importante entre los años 2004 a 2006, ver Cuadro 8. Con respecto al tipo de muestras, el LB fue el más requerido. Como lo describe la literatura, la principal razón es la versatilidad, el abordaje semi-invasivo, la facilidad y la rapidez con la que se puede trabajar con este tipo de muestra. Además, es necesario considerar que el procedimiento de toma de biopsia implica riesgos quirúrgicos relacionados con el neumotórax, hemoptisis y otras complicaciones hasta en el 10 % de los pacientes sometidos a este procedimiento (Wagner y Chaisson, 2004).

Con respecto a la muestra de EXP, Bennett et al (2009), mencionan que el esputo obtenido de manera espontánea o inducida por inhalación de solución salina hipertónica, representa el método más fácil y menos invasivo; sin embargo tanto Young en 1996 como Wagner y Chaisson en 2004, definen que el LB y el lavado bronquioloalveolar (LBA) son específicos y sensibles para la búsqueda de Pj considerando además, la indagación de otros procesos detectables que causan problemas respiratorios en pacientes con el SIDA y otras inmunosupresiones individuales. En el Laboratorio de Citología, la detección para Pj en las EXP ocurrió con baja frecuencia, destacando sustancialmente que la aportación del diagnóstico en dichas muestras, ocurrió durante el tiempo en que la remisión de Bx al servicio de AP se redujo (2004-2006). Esta carencia de estudios histológicos en la mitad del decenio provocó el ascenso temporal de la EXP, ver Fíg. 10. En nuestra experiencia, la aplicación de la tinción de Grocott modificada en la EXP, ofrece grandes

inconvenientes al presentar en el material, una reacción tintorial en la totalidad de sus componentes y que al ser abundantes, causan confusión, demora y difícil interpretación al observador. Será necesario utilizar otros métodos para esta muestra y al respecto, algunos autores como Van *et. al.*, 2007, refieren la técnica de PCR como factible, al considerarla eficaz y no invasiva. En el servicio de AP, no se cuenta con esta herramienta pero se dispone de muestras con las que sería posible desarrollar protocolos internos de estudio para aprovechar al máximo este material y aumentar el índice diagnóstico.

La práctica limitada de BAAF (16 muestras en 10 años) puede comprenderse porque esta técnica se utiliza casi exclusivamente para la investigación de enfermedades sospechosas de malignidad. Está indicada para pacientes con tumores pulmonares que por ubicación no se encuentran al alcance de las técnicas broncoscópicas y la respuesta diagnóstica definitiva es necesaria sin tener que recurrir a la biopsia a cielo abierto, o cuando se advierte un nódulo pulmonar solitario de naturaleza incierta después de haber realizado una investigación broncoscópica (Young, 1996).

Desde el punto de vista patológico, es necesario mencionar que la interpretación del diagnóstico de Pj requiere una apreciación integral y esto incluye la cuidadosa interpretación de los datos clínicos, los antecedentes del paciente, la imagen radiográfica y el material observable en las muestras citológicas e histológicas con el fin de seleccionar la implementación de las distintas herramientas diagnósticas disponibles. Para su demostración, el estudio morfológico debe basarse en las características del hongo y en la reacción tisular o celular que produce (Puras *et al.*, 2000). En este punto, las contribuciones realizadas por el Laboratorio de Citología del INER para favorecer la detección son:

- La promoción de mejores técnicas de fijación y la utilización de la solución de Carbowax desde 1993 para todas las muestras líquidas.
- El establecimiento desde 1997 de un protocolo de tinciones especiales definido para todas las muestras líquidas provenientes de pacientes seropositivos para el VIH, como apoyo a la búsqueda de oportunistas más específica. Durante la revisión del LB fue frecuente encontrar células del tracto orofaríngeo como contaminantes, lo que no admitió la inclusión de la tinción de Gram para la búsqueda de bacterias.
- El almacenamiento permanente del botón celular en las muestras líquidas, permitió repetir o ampliar el juego de tinciones disponibles para sustentar algún diagnóstico.

Existe la posibilidad de incluir el CB colectado simultáneamente al LB y la Bx para la indagación de un diagnóstico infeccioso al percibir que los datos de éste espécimen apoyan el contexto general. Así, cuando el LB resulta negativo a la tinción de metenammina de plata de Grocott, no es viable, o no existe y el CB demuestra con tinción de PAP el típico material proteináceo espumoso que sugiere la presencia de ascas en alguna de sus laminillas, es conveniente realizar la tinción de Grocott modificada (previa decoloración) sobre alguna de ellas. Este procedimiento resultó de utilidad en algunos casos como diagnóstico emergente basado en una cantidad de elementos provenientes o cercanos al sitio de investigación. Durante los diez años de estudio, el diagnóstico de Pj fue descrito en dos casos exclusivamente por esta muestra y en otros 15 casos confirmó la presencia de Pj sincrónicamente al LB ó a la Bx. Considerando algunas demoras por la elaboración que implica, representa un proceso potencial de búsqueda infecciosa para aumentar la posibilidad de detección de Pj u otros microorganismos y sería conveniente ajustar un protocolo de tinciones especiales aplicados al CB monitoreando su sensibilidad, especificidad y eficacia para definir la conveniencia de instalarlo en la rutina infecciosa.

El procedimiento diagnóstico en el servicio de AP definió la presencia de Pj en el 18 % de los estudios examinados, ver Cuadro 9. A excepción de la BAAF, el diagnóstico se percibió en todas las muestras. La detección mostró una tendencia con dos picos en los años 2003 y 2008 representados por muestras de LB y Bx; y entre ellos, un importante descenso, ver Fíg. 10. Los procedimientos de detección permiten definir que el instituto como centro de referencia, cuenta con la capacidad para distinguir la presencia persistente de Pj y las fluctuaciones observadas podrían señalar altibajos de incidencia; sin embargo, es complicado interpretar una conducta específica al considerar varias situaciones que fueron detectadas.

La disminución en los procedimientos de toma de muestra de estudios histológicos entre los años 2004 y 2006 y de los citológicos entre 2003 y 2004 ver Cuadro 8., ocasionó un descenso de datos que podrían malinterpretar nuestros resultados y enmascarar algún patrón de comportamiento. Entre algunas de las situaciones que pudieron influir, citamos la disminución de personal médico que realizó los procedimientos de toma de muestras broncoscópicas o la remodelación de las instalaciones en algunos servicios justo en los periodos mencionados. En este punto es importante señalar que a partir del año 2004, la participación del CIENI presentó una intervención más activa y directa en los pacientes tratados en el INER, incidiendo también en la cantidad y tipo de muestras tomadas para su análisis patológico.

Otra situación involucra la historia de concentración de pacientes con el SIDA en la ciudad de México y su implicación con la efectividad del TARAA. De acuerdo con cifras de la SS, entre el año 2001 y el año 2003 el presupuesto destinado a la compra de medicamentos antirretrovirales (Arvs) por parte de esa dependencia se incrementó de 30 millones de pesos a 367 millones, lo que permitió ofrecer tratamiento a 12 mil personas viviendo con el virus y la cobertura con medicamentos Arvs pasó del 85 % a cerca del 100 %, disminuyendo de manera importante la presencia de organismos oportunistas con repercusión a largo plazo (Gutiérrez *et al.*, 2004; Soler, 2009). Sería interesante realizar una comparación con la década anterior para dilucidar al respecto.

Un acontecimiento particular que produjo el descenso en la detección de Pj, está relacionada con el arribo de la pandemia de influenza H1N1 al país durante el año 2009. La mayor concentración poblacional ocurrió en la Ciudad de México y el INER intervino como el principal centro de referencia. El instituto procedió con acciones inmediatas que repercutieron directamente en la disminución de muestras tomadas a pacientes con el VIH a fin de proveer de manera preferente la atención médica a pacientes con influenza. No obstante a este suceso, a partir del año 2007 y hasta el 2010 se alcanzó una alta frecuencia en la detección clínica y broncoscópica de pacientes con Pj comprobada por estudios citológicos e histológicos.

Estas últimas evidencias apoyan la opinión de Gayet y Gutiérrez (2012) al considerar que todavía a estas fechas, existe un aumento constante de la enfermedad causada por el VIH en México. Será necesario extender nuestros resultados apoyados en los historiales manifestados en los expedientes del archivo clínico y orientar la posibilidad de demostrar el comportamiento de Pj a lo largo del tiempo en nuestro instituto; asimismo, desarrollar investigaciones multidisciplinarias que permitan entender la conducta biológica de Pj y los mecanismos de respuesta del huésped para indagar si los estadísticos que se presentaron en este trabajo realmente apuntan a su prevalencia o solo reflejan causas sociodemográficas. Un estudio realizado en México referente a la respuesta frente a la epidemia contra el VIH/SIDA, indicó que el contar con una clínica atendida por infectólogos con experiencia en el manejo de estos pacientes es en parte, responsable del éxito y se arguye que el hecho de mantener a un buen número de pacientes en protocolos de investigación clínica, favorece la identificación y el tratamiento oportuno de complicaciones (Gutiérrez *et al.*, 2004).

La detección de Pj es una materia de debate como lo explica Helweg-Larsen en 2004, ya que en muchas ocasiones la aplicación del TARRA y un tratamiento de profilaxis temprana sin la confirmación diagnóstica de su infección, evita definir patrones de comportamiento, principalmente por la inconveniente especificidad de los signos clínicos.

Las técnicas para demostrar a Pj son muy variadas y representan una gran gama de alternativas. Abundantes estudios describen el manejo de muestras respiratorias combinadas con distintas tinciones colorimétricas, el uso de anticuerpos o la amplificación genética por PCR, que se describen como métodos que ofrecen rangos distintos en sensibilidad, especificidad y costos. Los Laboratorios de Microbiología o Micología realizan la detección dirigida a patógenos específicos principalmente por solicitud. Aún con sus limitantes, los métodos de investigación en el servicio de Laboratorio de Citología, son convenientes desde que permite correlacionar el contexto clínico y celular, optimizar cada muestra y emplearla con distintas herramientas diagnósticas. La exploración de rutina es dirigida ampliamente a la percepción de cualquier etiología que muestre evidencias de daño tisular o celular y para la técnica de metenamina de plata de Grocott, se ha modificado la exposición a los reactivos para abreviar los tiempos en el proceso integral de la interpretación. La experiencia integral obtenida durante varios años, respalda los resultados eficazmente.

La infección concomitante de Pj con otros patógenos se describió en 1 % de las muestras y pertenecieron en orden descendente a virus, micobacterias, otras micosis y bacterias. Conjuntamente se presentó en pacientes que sostenían alteraciones funcionales como EPOC (tres casos), fibrosis quística y NI idiopática. Dei-Cas *et al.* (2011) mencionan que especialmente en la EPOC, Pj induce cambios inflamatorios locales o sistémicos que contribuyen a las exacerbaciones y aceleran la evolución de la afección en condiciones de conteo de inmunosupresión severa. Romero, *et al.* 2011, refieren la existencia de infecciones respiratorias mixtas en aproximadamente el 10 % de pacientes con el VIH que presentan un profundo deterioro inmunológico y refieren que los resultados obtenidos dependerán de la metodología elegida para visualizar además de Pj a una amplia gama de microorganismos. El número de coinfecciones detectadas pudo ser influida por la limitada búsqueda de bacterias y la falta de aplicación de técnicas de exploración en la rutina. Ewig *et al.*, (2011) establecieron que las coinfecciones no parecen ser relevantes en la mortalidad del los pacientes portadores, pero el diagnóstico de las mismas favorece su tratamiento inmediato.

Para evaluar los resultados sobre la detección de Pj, fue indispensable realizar la correlación del procedimiento clínico-patológico. Encontramos una buena concordancia para los casos con diagnóstico clínico confirmado corroborado con estudios citológicos e histológicos. Los casos que contaron con diagnóstico clínico de sospecha para Pj, reflejaron valores similares en las muestras evaluadas en AP, lo que se traduce como un proceso confiable y sensible. Sin embargo, el hallazgo de Pj en aquellas muestras con referencia ausente en los datos clínicos, realza la importante labor de detección que realiza el servicio de AP para descubrir a Pj. La cantidad de diagnósticos descritos por el examen patológico fue mayor tanto en muestras de LB y Bx que en muestras de CB y EXP y considerando la ausencia en el diagnóstico clínico, la descripción patológica de las muestras broncoscópicas aportó esencialmente el diagnóstico. Estos hallazgos son relevantes al considerar como lo refiere Dei-Cas *et al.* (2008), que representan el enmascaramiento clínico o el estadio asintomático. Igualmente, se advierte la importancia de reconsiderar el tipo de abordaje clínico utilizado y al personal del hospital que interviene en el estudio con la finalidad de propiciar el diagnóstico de infección en una fase temprana, dependiendo claramente de la eficacia en la realización de todos y cada uno de los procesos. Estos hechos aportan las justificantes necesarias para promover modificaciones trascendentales con fines asistenciales, docentes y de investigación.

La evaluación de la calidad del diagnóstico de las muestras requirió del correcto cumplimiento de una serie de condiciones como: la historia clínica completa, la toma de muestra representativa del sitio de elección, la ejecución apropiada del método de muestreo, la correcta disposición de la muestra, la fijación adecuada y el envío oportuno al servicio de AP. El sitio de muestreo debe contener la presencia de tegumentos con elementos celulares propios del sitio donde este hongo se reproduce y debe ofrecer un número suficiente de alvéolos y bronquiólos en el caso de la biopsia pulmonar, y para las muestras citológicas requiere de una colección de secreciones mucosas, material proteináceo, células inflamatorias, suficientes macrófagos, células epiteliales cilíndricas ciliadas provenientes de la luz bronquial y espacios alveolares, de tal manera que sean consideradas representativas para su interpretación (Johnston, 1992). La adhesión del parásito a los neumocitos tipo I y la formación de una matriz extracelular definida como exudado proteináceo sobre los mismos, marcan el material apropiado para realizar su búsqueda; no obstante, ésta es una tarea difícil considerando que las células que serán examinadas posteriormente no son perceptibles a simple vista durante la toma de la muestra.

La certeza diagnóstica de Pj se logró por la demostración del microorganismo en 18 % de las muestras consideradas en el servicio de AP como adecuadas y de la población total representó el 17.4 %. El procedimiento broncoscópico fue el método más acertado para lograrlo y es necesario puntualizar que el muestreo con el CB se vio limitado debido al diámetro del cepillo y aunque exhibieron numerosas células columnares ciliadas mezcladas con pequeñas cantidades de células secretoras de moco, realmente no tiene acceso a la zona alveolar en cuyo sitio se alberga Pj.

1784 (82 %) muestras consideradas como adecuadas no reportaron la presencia de Pj, sin embargo obtuvieron diagnósticos concretos; esto reafirma que pacientes con infección por el VIH presentan otras patologías disfuncionales y neoplásicas, ver Tabla 13. En este grupo se incluyeron 52 (2.3 %) estudios con diagnóstico patológico de “probable presencia de Pj”, ya que no fue posible demostrar al organismo por tinciones especiales, aunque contaron con datos fuertemente sugerentes en las tinciones de rutina (PAP y HE).

Sólo en 115 (5 %) muestras evaluadas por el servicio de AP no se logró establecer algún diagnóstico por dificultades o errores en el procedimiento de muestreo, ver Cuadro12. En sus descripciones, las principales causas refirieron contextos de material hemorrágico, hemólisis, necrosis, tejido fibroconectivo o escasa celularidad y por tanto se consideraron como inadecuadas, ver Anexo 2. El análisis por tipo de muestra, definió que las BAAF y las Bx disminuyeron su valor diagnóstico por estos motivos, ver Cuadro14; mientras que el análisis por año señaló principalmente a las Bx y los CB como inapropiadas con incremento en la segunda mitad de la década, ver Cuadro15. Las evidencias encontradas indican que existen discrepancias en el manejo de las muestras y será necesario revisar puntualmente todos los procesos implicados; desde la obtención de la muestra hasta la valoración microscópica para definir los inconvenientes que han afectado la precisión del diagnóstico. Instalar evaluaciones periódicas en cada uno de dichos procesos sumado a constantes actualizaciones y retroalimentación interdisciplinaria impactaría en una total eficacia.

Finalmente, relacionados al control de calidad y dirigidos a un mejor servicio, se requiere la implementación de indicadores de confiabilidad en todos los procesos involucrados, ya que la organización del instituto ha cambiado conforme el incremento de volumen y complejidad de los casos de estudio. La capacidad del personal, la seguridad del paciente y el control de errores no diagnósticos deben sustituirse por sistemas donde predomine la seguridad, eficiencia en el trabajo y su calidad objetivamente acreditable. Por parte del Laboratorio de Citología, es aconsejable la extensión de técnicas de tinciones especiales, la aplicación de controles positivos de manera constante, la implementación de técnicas diagnósticas para microorganismos a veces imperceptibles que involucran al pulmón en su ciclo de vida como *Acanthamoeba* spp. y *Toxoplasma gondii*, la elaboración de manuales de procedimientos y la capacitación del personal en diagnósticos específicos como *Strongyloides stercoralis* y diversos virus desde el manejo del material hasta su detección microscópica. Un objetivo más, será implementar un sistema de gestión de calidad mediante el establecimiento de estándares para evaluar el desempeño y los resultados de los procesos, cumpliendo con la preparación necesaria para participar en la obtención de la certificación ante el ISO-9001:2008 ofreciendo competencia a nivel nacional e internacional.

### XIII. CONCLUSIONES

Consideramos un gran mérito, la actividad constante que se realiza en el INER para atender y resolver las afecciones que afectan a los pacientes con el VIH. La atención de las complicaciones pulmonares asociadas permite orientar el proceso institucional y las intervenciones multidisciplinarias proporcionan el soporte para el manejo médico. El diagnóstico temprano, la introducción de antirretrovirales y la profilaxis antimicrobiana en infecciones oportunistas son las bases esenciales para ofrecer la atención de calidad.

Los pacientes con sospecha y VIH confirmado que presentaron afecciones respiratorias fueron abordados por distintos métodos para la emisión del diagnóstico clínico. En el periodo de 2001 a 2010, el procedimiento de toma más importante para la búsqueda de Pj se realizó por el método broncoscópico con obtención de LB, CB Y Bx. En promedio, se practicaron dos a tres muestras simultáneas por paciente para su identificación microscópica y la muestra principal para este efecto resultó ser el LB.

A la investigación patológica, los estudios respiratorios para confirmar el diagnóstico, presentaron un incremento progresivo en número de muestras citológicas y una práctica variable en las histológicas. Con mayor frecuencia el diagnóstico de Pj fue aportado por el LB apoyado por la Bx pulmonar. La EXP y el CB prevalecieron con baja frecuencia de detección, pero se consideran con potencial de investigación mediante la aplicación de métodos de PCR e incorporación en la rutina de tinciones especiales respectivamente, mientras que la BAAF presentó nulidad diagnóstica. Durante 10 años, Pj continuó siendo un hongo persistente en pacientes con el VIH y será necesario un análisis más definido para puntualizar su conducta.

La buena concordancia que existe entre los diagnósticos clínico y patológico se traduce en la confiabilidad de los procedimientos para los casos confirmados dentro del Instituto. Los procedimientos de calidad definieron que los métodos de muestreo son apropiados para la búsqueda de Pj, con representatividad y buena conservación en la mayoría de los casos, con gran posibilidad de transformar los estudios inadecuados y obtener progresos en los procedimientos; proceso que favorece a los pacientes ya que basta con una corta estancia que impacta directamente en bajos costos en comparación con los pacientes hospitalizados.

El laboratorio de Citología ha contribuido amplia y específicamente para confirmar el diagnóstico de Pj con métodos de fijación y la integración de un protocolo de investigación basado en tinciones especiales para microorganismos y la importancia de comprender los principios básicos de la colección y remisión de la muestra fomentando las destrezas necesarias para hacerlo, optimizará el valor de la citología como herramienta diagnóstica. La prevalencia del VIH justifica la realización temprana del diagnóstico de agentes patológicos, principalmente de Pj.

La revisión más específica de los resultados obtenidos aceptando nuevas variaciones y metodologías, podría expresar la trascendencia clínica, una participación multidisciplinaria más activa y por consecuencia el avance de los conocimientos científicos, médicos y de enseñanza dirigidos al servicio de calidad.

#### XIV. PROYECTOS A FUTURO

La realización de este estudio apoyará en el mejoramiento del proceso de toma de muestra, ofreciendo las especificaciones necesarias requeridas para adquirir las destrezas necesarias y asegurar la apropiada obtención mediante la retroalimentación con los servicios que lo realizan.

Este estudio permitirá entender la necesidad de implementar técnicas diagnósticas para la detección microscópica de microorganismos pulmonares imperceptibles, promoverán la elaboración de manuales de procedimientos y mayor capacitación del personal del Laboratorio de Citología en diagnósticos específicos con el fin de evitar errores que trasciendan en el diagnóstico del paciente.

Las cifras y datos obtenidos permitirán plantear proyectos de modificación para el proceso citológico con base a la implementación de otras herramientas diagnósticas como las técnicas de detección por inmunocitoquímica o por biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa en las distintas muestras para lograr el máximo aprovechamiento del material y ofrecer diagnósticos más precisos.

Los resultados de este trabajo se utilizarán para la comparación con otros estudios relacionados así como para realizar estudios de investigación con otras Instituciones, mejorar los métodos de diagnóstico y la elaboración de manuales.

Los datos de los pacientes incluidos en esta población podrán incluirse en estudios epidemiológicos con posibilidad de obtener inferencias estadísticas de la enfermedad.

Promoverá la implementación de indicadores de calidad para integrar en el sistema de gestión de calidad mediante el establecimiento de estándares de evaluación para el desempeño de los procesos y permitir la competencia a nivel nacional e internacional.

La información obtenida se aprovechará para la implementación de sistemas informáticos y telepatología con el fin de apoyar con nuestros conocimientos y experiencia a otras instituciones en el país, para atender consultas a distancia y beneficiar a la población que carece de posibilidades para acudir a consulta al INER.

A.1. Hoja de recolección de datos clínicos y patológicos utilizada en el servicio de AP

Año	Tipo de estudio	No. Cx	No. Hx	Nombre del Paciente	Edad	Sexo	Tipo de muestra	Diagnóstico Clínico									
								VIH	Pj	Myc	Neo	Mic	Viral	Bac	Otros parásitos	NI	Neu

Año	Tipo de estudio	No. Cx	No. Hx	Nombre del Paciente	Edad	Sexo	Tipo de muestra	Diagnóstico Patológico												Adecuación	Certeza
								Al	Pj	Myc	Neo	Mic	Viral	Bac	Otros parásitos	NI	Neu	EPOC	SA		

**A.2. Clasificación de diagnósticos clínicos y patológicos con base a criterios del CIE-10: OMS y la experiencia del servicio de Anatomía Patológica hacia distintas entidades etiológicas pulmonares y criterios de viabilidad para las muestras.**

Diagnóstico Adecuado		Diagnóstico Inadecuado
<b>Específico</b>	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (Pj) Compatible con Pj	Hemorragia alveolar Hemorragia reciente Hiperplasia adenomatosa atípica Inadecuado Material hemático Necrosis y hemólisis Sin parénquima Tejido fibroconectivo
<b>Inespecífico</b>		
Myc	<b>Micobacterias</b> Granuloma, sugestivo, compatible, secundario a Lesión granulomatosa Micobacterias atípicas Micobacteriosis <i>Mycobacterium</i> spp. Tuberculosis, sugestivo, compatible Tejido de granulación	
Neo	<b>Neoplasia</b> Adenocarcinoma, compatible Carcinoma Carcinoma de células pequeñas Carcinoma epidermoide Células malignas Coriocarcinoma Displasia moderada Lesión linfoproliferativa, linfoma Sarcoma de Kaposi Sugestivo de malignidad	
Mic	<b>Micosis</b> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Blastomyces</i> spp. vs <i>Paracoccidioides</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp. <i>Criptococcus</i> spp. Esporas Granuloma, sugestivo, compatible, secundario a Hifas y esporas <i>Histoplasma</i> spp. Hongo no determinado Levaduras Sugestivo de Pj	
Vir	<b>Viral</b> Adenovirus Citomegalovirus Herpes Herpes - varicela Influenza virus H1N1 Molusco Viral	
Bac	<b>Bacteriana</b> Bacterias Gram + ó - Flora bacteriana mixta, cocoide o bacilar <i>Nocardia</i> spp.	
SA	<b>Sin alteraciones</b>	

AI	<u>Alteraciones inflamatorias</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Atipias en neumocitos</li> <li>Cambios epiteliales y estromales</li> <li>Displasia y metaplasia epidermoide</li> <li>Edema</li> <li>Hiperplasia de neumocitos</li> <li>Inflamación crónica y fibrinosa</li> <li>Metaplasia atípica</li> <li>Regeneración atípica</li> </ul>
NI	<u>Neumopatía Intersticial</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Daño alveolar difuso</li> <li>Neumonitis intersticial</li> <li>Neumopatía Intersticial</li> </ul>
Neu	<u>Neumonía</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Absceso, compatible con</li> <li>Bronquiolitis obliterante obstructiva pulmonar</li> <li>Colapso por hipertrofia e hiperplasia</li> <li>Colapso y fibrina congestiva</li> <li>Daño pulmonar compatible a drogas</li> <li>Inflamación crónica y fibrinosa</li> <li>Neumonía atípica</li> <li>Sepsis</li> <li>Síndrome de insuficiencia respiratoria aguda</li> <li>Úlcera aguda</li> </ul>
EPOC	<u>Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Asma</li> <li>Bronquitis</li> <li>Bulas</li> <li>Enfisema pulmonar</li> <li>Fibrosis</li> <li>Peribronquiolitis</li> <li>Silicoantracosis</li> </ul>
Otros	<u>Otras patologías</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cambios pulmonares poco relevantes</li> <li>Colapso pulmonar o alveolar</li> <li>Displasia broncopulmonar</li> <li>Estructuras esferuloideas</li> <li>Hiperplasia linfoide peribronquial</li> <li>Infiltrado linfoplasmocitario</li> <li>Inflamación crónica linfoplasmocitaria</li> <li>Lesión polipoide</li> <li>Parénquima colapsado</li> <li>Proliferación estromal fibrovascular</li> <li>Parásitos</li> </ul> <hr style="border: 0.5px solid black; margin-top: 5px;"/> <ul style="list-style-type: none"> <li>Larvas filarias</li> <li>Microorganismo no determinado</li> <li><i>Strongyloides stercoralis</i></li> </ul>

**A.3. Fórmula de fijación citológica propuesta por el Dr. Geno Saccomanno y modificada para el laboratorio de citología (Johnston y Frable, 1979; Koss, 1979)**

Solución de Carbowax. Técnica de Saccomanno para la fijación de fluidos citológicos.

Reactivos:

- Rifampicina en solución alcohólica
- Polietilenglicol en solución alcohólica
- Etanol 50 %

Preparación de soluciones base:

- Rifampicina solución alcohólica

- Rifampicina (Rifater 300 mg)            1 cápsula
- Etanol 50 %                                    100 ml

- Polietilenglicol solución alcohólica

- Polietilenglicol hojuelas  
(Polyethylene Glycol Av. ML Wt.1450 Marca Sygma)            50 g
- Etanol 96 %                                    100 ml

- Solución de etanol 50 %

- Etanol 96 %                                    520 ml
- Agua destilada                                480 ml

- Solución de trabajo de Carbowax (1 L)

- Rifampicina solución alcohólica    20 ml
- Polietilenglicol solución alcohólica 20 ml
- Etanol 50 %                                    960 ml

**ESPECIFICACIONES:**

- Polietilenglicol.- Permite mantener la estructura de las células.
- Rifampicina.- Actúa como bacteriostático.
- Etanol.- Fijador del material celular.

#### A.4. Tinciones de rutina y especiales para la identificación de Pj usadas en AP del INER

##### A.4.1. Tinciones de rutina

Tinción de Papanicolaou 1942.

Método de tinción rutinaria para muestras citológicas que proporciona cromatina nuclear bien teñida, contraste diferencial y transparencia del citoplasma. Los solventes empleados en la preparación de la solución tintórea ayudan a elevar el índice de refracción y favorecen la evaluación morfológica y la relación celular (Johnston, 1992; Cox, 1976).

Procedimiento técnico:

1. Hidratación de laminilla con agua de la llave.
2. Hematoxilina de Harris\*, durante 15 segundos.
3. Lavado con agua corriente.
4. Aplicación de dos cambios de etanol 96 % durante 30 segundos.
5. Orange G\* durante 1 minuto.
6. Retiro del colorante con dos cambios de etanol 96 % por 30 segundos cada uno.
7. Eosina Azur\* 50 por 1 minuto.
8. Retiro del colorante con tres cambios de etanol 96 % por 30 segundos.
9. Deshidratación, aclaramiento y montaje.

\*Colorantes marca Merck

Resultados:

- |               |  |
|---------------|--|
| - Núcleos     | azul / morado  |
| - Citoplasma  | verde-azul al rojo dependiendo de la madurez de la célula. |
| - Eritrocitos | naranja  |
| - Moco        | azul claro a verde   |

## Tinción de Hematoxilina-eosina

Método de tinción rutinaria para muestras histológicas que consta de una fase inicial, en la que se colorean los núcleos celulares con la hematoxilina, y una fase ulterior de contraste citoplásmico y componentes extracelulares. Modificación y reactivos adaptados para el laboratorio de histología en el servicio de AP del INER (García del Moral, 1993).

### Procedimiento técnico:

1. Desparafinar e hidratar
2. Teñir con hematoxilina de Harris\* de 5 a 10 minutos.
3. Enjuague con agua corriente.
4. Diferenciar en alcohol ácido al 5 % durante dos sumergidas.
5. Virar el pH con agua amoniacal al 3 % por 30 segundos.
6. Contrastar con solución de eosina "Y" alcohólica\* durante 10 a 30 segundos.
7. Lavar en agua corriente.
8. Deshidratar, aclarar y montar.

\*Colorante marca Merck

### Resultados:

- |                         |               |
|-------------------------|---------------|
| - Núcleos               | azul / morado |
| - Eritrocitos           | rosa          |
| - Estructuras restantes | rosado a rojo |

#### A.4.2. Técnicas para la identificación de hongos.

##### Tinción de metenamina de plata de Grocott modificada

Oxida los hidratos de carbono de la pared y membrana de las distintas formas fúngicas. Modificaciones y reactivos adaptados para el laboratorio de citología en el servicio de AP del INER (García del Moral, 1993).

##### Procedimiento técnico:

1. Hidratación de laminilla con agua destilada.
2. Ácido crómico 5 %, durante 30 minutos.
3. Lavado con agua corriente.
4. Bisulfito sódico 1 % durante 1 minuto.
5. Lavar con agua destilada con tres cambios.
6. Solución de trabajo:
  - Hexametilentetramina 3 %      5 ml
  - Agua destilada                      5 ml
  - Borato de sodio 5 %              1 ml
  - Nitrato de plata 5 %              0.75 ml
- Colocar al horno de microondas a máxima potencia por 15 segundos.
7. Lavar con agua destilada dos cambios.
8. Tiosulfato sódico 2 % por 10 segundos.
9. Lavado con agua corriente.
10. Contrastar con verde luz\* por 2 minutos.
11. Deshidratar, aclarar y montar.

\*Colorante

##### Resultados:

- Formas fúngicas      café
- Tinción de fondo      verde

### Tinción de Ácido peryódico de Schiff (PAS)

Técnica descubierta de forma independiente y simultáneamente por Hotchkiss, Mc Manus y Lillie en 1948 (*op. cit.*).

Oxida los hidratos de carbono seguido por una reacción de doble enlace que produce un característico color fucsia.

#### Procedimiento técnico:

- 1- Hidratación de laminilla con agua de la llave.
- 2- Acido peryódico 0.5 % durante 15 minutos.
- 3- Lavado con agua destilada.
- 4- Reactivo de Schiff\* durante 30 minutos.
- 5- Lavado con agua corriente.
- 6- Hematoxilina de Harris\*\* por 10 segundos.
- 7- Lavado con agua corriente.
- 8- Deshidratar, aclarar y montar.

\* Reactivo elaborado para los laboratorios de histología y citología del servicio de AP del INER

\*\* Colorante marca Merck

#### Resultados:

- Núcleos azul
- Material positivo fucsia

**A.5. Márgenes propuestos por Byirt (1996) para valorar el grado de acuerdo en función al Índice de Kappa de Cohen (1960), Dawson y Trapp, 2001; Szklo y Nieto, 2003**

<b>Kappa</b>	<b>Grado de acuerdo</b>
0.93 – 1.00	Excelente
0.81 – 0.92	Muy bueno
0.61 – 0.80	Bueno
0.41 – 0.60	Regular
0.21 – 0.40	Malo
0.01 – 0.20	Muy malo
$\leq 0.00$	Sin acuerdo

## XVI. REFERENCIAS

Aliouat-Denis, C. M., Martínez, A., Aliouat, el M., Pottier, M., Gantois, N., Dei-Cas, E. 2009. The *Pneumocystis* life cycle. *Memorial Institute Oswaldo Cruz*. 104 (3):419-426

Álvarez, M. M. 2008. *Prevalencia de Pneumocystis jirovecii con Mutaciones Asociadas a Resistencia a las Sulfamidas en Pacientes con Infección por VIH-1. Estudio de los Factores de Riesgo y Valor Pronóstico en la Neumonía por Pneumocystis jirovecii (PcP)*. Tesis doctoral en medicina. Departamento de Anatomía Patológica, Farmacología y Microbiología, Universidad de Barcelona, España. pág. 15

Bartlett, M. S y Smith, J. W. 1991. *Pneumocystis carinii*, an opportunist in inmunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*. 4 (2):137-149

Beck, J. M. y Cushion, M. T. 2009. *Pneumocystis* Workshop: 10<sup>th</sup> Anniversary Summary. *Eukaryotic Cell*. 8 (4):446-460

Bennett, N. J., Gilroy, S. A. y Rose, F. B. 2009. *Pneumocystis (carinii) jirovecii* pneumonia. *Medscape Continous Medical Educations*. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/25976>. Accesado el 3 de agosto de 2012.

Calderón, J. E., Arredondo, G. J. L., y Zavala, T. I., 2003. *El Virus de la Inmunodeficiencia y el SIDA. Conceptos Clínicos de Infectología*. 12° ed. Editorial Méndez. México. pp. 135-177

Caro-Murillo, A. M., Castilla, J., Pérez-Hoyos, S., Miro, J. M., Podzamczar, D., Rubio, R., Riera, M., Viciano, P., López, A. J., Iribarren, J. A., De los Santos-Gil, I., Gómez-Sirvent, J. L., Berenguer, J., Gutiérrez, F., Saumoy, M., Segura, F., Soriano, V., Peña, A., Pulido, F., Oteo, J. A., Leal, M., Casabona, J., Del Amo, J. y Moreno, S. 2007. Cohorte RIS de pacientes con infección por VIH sin tratamiento antirretroviral previo (CORIS): Metodología y primeros resultados. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 25 (1):23-31

Casanova, C. L. 2006. El Género *Pneumocystis* y la neumocistosis. **En:** Méndez-Tovar, L.J., López-Martínez, R., Hernández-Hernández, F. *Actualidades en Micología Médica*. VI Diplomado en Micología Médica. 3° (Eds.) Facultad de Medicina. UNAM. México pp. 369-381

Catalogue of Life 2011 Annual Checklist. Annual Checklist Interface v1.6 (r1152) developed by ETI Bioinformatics. Disponible en <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2011> Accesado el 09 de mayo de 2013.

Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas, CIENI. 2012. Disponible en <http://www.cieni.org.mx/investigacion>. Accesado el 06 agosto de 2012.

Centers for Disease Control and Prevention. 2012. USA. Disponible en <http://www.cdc.gov>. Accesado el 14 de abril de 2013.

Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10, 10ª revisión. Organización Mundial de la Salud. Disponible en <http://www.ms.gba.gov.ar/EstadodeSalud/cie10/cie10pdf>. Accesado el 06 agosto de 2012.

Cordero, M. E., Rodríguez, H. M. J. y Pachón, D. J. 2003. Neumonías en pacientes con infección por el VIH. **En:** Pachón, J., Pujol, E. y Rivero, A. *La Infección por el VIH: Guía Práctica*. 2a ed. Sociedad andaluza de enfermedades infecciosas. España. pp. 145-154 Disponible en: <http://saei.org/hemero/libros/guía2003.asp>. Accesado el 06 agosto de 2012.

Cox, H. S. 1976. *Citotecnología Médica*. El Manual Moderno. México. pp. 23-31

Cruz, M. E. 2010. Bases Morfológicas de la función respiratoria. Cap. 1. **En:** *Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile*. Disponible en <http://www.escuela.med.puc/AparatoRespiratorio>. Accesado el 06 agosto de 2012.

Dawson-Saunders, B. y Trapp, R. G. 2001. Basic and Clinical Biostatistic. 3a ed. Lange Medical Books Mc-Graw-Hill. USA. 2001. p. 116.

Dei-Cas, E., Fleurisse, L., Aliouat, E. M., Bahon-Le, C. J., Cailliez, J. C. Y Creusy, C. 1998. Morphological and ultrastructural methods for *Pneumocystis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 22 (1):185-189 Disponible en <http://www.sciencedirect.com>. Accesado el 24 de abril de 2013.

Dei-Cas, E., Magali, C., Durand-Joly, I., Aliouat, C. M. y Aliouat, E. M. 2008. *Pneumocystis* y pneumocistosis. **En:** Méndez, L.J.T., López, M. R. y Hernández, H. F. *Actualidades en Micología Médica*. VII Diplomado en Micología Médica. 4° (Eds.) Facultad de Medicina. UNAM. México pp. 287-295

Dei-Cas, E., Martínez, A., Magali, C., Aliouat, E. M., Demanche, C. y Aliouat, C. M. 2011. Investigaciones sobre el ciclo biológico y la transmisión de *Pneumocystis* (Fungi: Ascomycota). **En:** Fernández, G. A., Bustos, J. I., Castañeda, P. C., Guevara, F. J. y Vázquez, M. H. *Mensaje Bioquímico*. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. 35:93-106 Disponible en: <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>. Accesado el 06 agosto de 2012.

Del Campo-Rodríguez, L. E. M. y Sifuentes-Osornio, J. 2004. Infecciones oportunistas en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida: La historia de México a 20 años del inicio de la epidemia. *Revista de Investigación Clínica*. 56 (2):169-180

DPDx. 2010. Parasite Image Library. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Disponible en [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/image\\_library.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/image_library.htm) Accesado el 24 de abril de 2013

El-Bayoumi, E. y Silvestri, G. A. 2008. Bronchoscopy for the diagnosis and staging of lung cancer. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 29 (3):261-270

Frenkel, J. K. 1976. *Pneumocystis jirovecii* n. sp. from man: morphology, physiology and immunology in relation to pathology. **En:** *National Cancer Institute Monograph*. 43:13-30

García, S. M. C., Pérez, G. L. E., Franco, M. F. y Reyes, T. G. 2003. Infecciones oportunistas pulmonares de pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 1991-2001. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*. 16 (1):6-10

García del Moral, R. 1993. *Laboratorio de Anatomía Patológica*. Interamericana-Mc Graw Hill. USA. 657 p.

Gayet, C. y Gutiérrez, J. P. 2012. La epidemia de VIH/SIDA en México ¿estabilizada? *Sociedad Mexicana de Demografía*. SOMEDE. 10:1-4

Getachew, A. 2007. *Pulmonary Tuberculosis and Pneumocystis jirovecii Pneumonia in HIV Infected Patients in Ethiopia*. Tesis de Doctorado en Enfermedades Infecciosas. Departamento de Medicina. Instituto Karolinska. Suecia. 47 p.

Greuter, W. C., Mcneill, J. VC., Barrie, F. R., Burdet, H. M., Demoulin, V., Filgueiras, T. S., Nicolson, D. H., Silva, P. C., Skog, J. E., Trehane, P., Turland, N. J. y Hawksworth, D. L. 2000. International Code of Botanical Nomenclature. Adopted by the Sixteenth International Botanical Congress, St. Louis, Missouri, July-August 1999. *Regnum Vegetabile*. 138:1-474 Disponible en: <http://www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/SaintLouis/0000St.Luistitle.htm>. Accesado el 05 de mayo de 2013.

Grupo de consenso AABE para la elaboración de normas para la realización de fibrobroncoscopía. 2009. Consenso de la Asociación Argentina de broncoesofagología para la realización de fibrobroncoscopía. *Revista Americana de Medicina Respiratoria*. 9:196-209

Gutiérrez, J. P., López, Z. J. L., Valencia, M. A., Pesqueira, E., Ponce de León, S. y Bertozzi, S. M. 2004. Haciendo frente a la epidemia de VIH/SIDA en México: ¿Una respuesta organizada? *Revista de Investigación Clínica*. 56 (2):242-252

Helweg-Larsen, J. 2004. *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Danish Medical Bulletin*. 51;(3):251-73. Disponible en: <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16>. Accesado: 04 noviembre 2012.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER. 2012. Misión. Disponible en <http://www.iner.salud.gob.mx>. Accesado el 06 agosto de 2012.

Johnston, W. W. y Fable, W. J. 1979. *Cytopreparatory Methods. Diagnostic Respiratory Cytopathology*. Masson Publishing. USA pp. 5-11

Johnston, W. W. 1992. Role of Cytopathology in the Diagnosis of Opportunistic Infections of the Respiratory Tract and other Nongynecologic Sites. **En:** Wied, G. L., Keebler, C. M., Koss, L. G., Patten, S. F. y Rosenthal, D. L. (Eds.) *Compendium on Diagnostic Cytology, Tutorials of Cytology*. 7ª Ed. Tutorials of Cytology, USA pp. 194-204

Koss, L.G. 1979. *Preservation of Fluid Specimens Prior to Processing. Diagnostic Cytology and its Histopathology Bases*. 3ª Ed. J.B: Lippincott Company, USA Vol. 2 pp. 1188-1220

Kumar, V. y Cotran, R. S. 2003. *Pulmonary Infections. The Lung and the Upper Respiratory Tract*. Robbins Basic Pathology. 7ª ed. Saunders. EUA pp. 478-481, 497-498

López, M. R., Méndez, T. L. J., Hernández, H. F. y Castañón, O. R. 2004. *Clasificación Clínica de las Micosis. Pneumocistosis. Micología Médica. Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio*. Trillas. México 192 págs.

Lumbsch, H. T. y Huhndorf, S. M. 2007. Outline of Ascomycota – 2007. *Myconet*. 13:1-3

Magis, R. C. y Del Río, C. C. 2000. Epidemiología del VIH y del SIDA en México. **En:** Ponce de León, R. S. y Rangel, S. F. (Eds.) *SIDA Aspectos Clínicos y Terapéuticos* Mc Graw Hill Interamericana. México 537 p.

Masachika, S. 1984. A reliable silver staining method for identification of *Pneumocystis carinii* in histologic sections. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 143:397-404

McNeill, J. V.C., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V., Greuter, W. C., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'home Van Reine, W. F., Smith, G. F., Wiersema, J. H. y Turland, N. J. 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants. Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress, Melbourne, Australia, July 2011. *Regnum Vegetabile*. 154, article 45.1 Ex. 6, Ex. 7 Disponible en: <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>. Accesado el 05 de mayo de 2013

Murdoch, D. R. 2003. Nucleic acid amplification test for the diagnosis of pneumonia. *Medical microbiology, Clinical Infectious Diseases*. 36:1162-70

Nawaz, K. A., Irion, K. L., Mac Donald, S. y Allen, C. M. 2008. Pneumonia, *Pneumocystis carinii*. *Medscape Continuous Medical Educations* Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/359972>. Accesado el 06 agosto de 2012.

National Center for Biotechnology Information NCBI. 2012. Taxonomía Filogenética. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>. Accesado el 06 agosto de 2012.

Norma oficial mexicana para la prevención y el control de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana. NOM-010-SSA2-1993 publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de junio del 2000. Accesado el 11 de abril de 2013.

Piana, L. P. 2012. *Neumonía por Pneumocystis jirovecii en pacientes VIH/SIDA*. Tesis de Postgrado en Clínica Médica. Universidad Nacional de Rosario, Colombia. Disponible en: [http://www.clinica-unr.com.ar/Posgrado/Graduados/Piana\\_Trabajo\\_Neumonia\\_PCP.pdf](http://www.clinica-unr.com.ar/Posgrado/Graduados/Piana_Trabajo_Neumonia_PCP.pdf). Accesado el 06 agosto de 2012.

Puras, G. A. M., Montes, D. M., Fernández, S. P. y López, C. A. 2000. Expresión morfológica de las infecciones fúngicas graves. Participación del patólogo en el diagnóstico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: 34-40

Redhead, S. A., Cushion, M. T., Frenkel, J. K. y Stringer, J. R. 2006. *Pneumocystis* and *Tripanosoma cruzi*: Nomenclature and Typifications. *Journal of Eukariotic Microbiology*. 53(1):2-11

Reyes-Terán, G. 2001. Magnitud del problema SIDA en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias: Implicaciones de la atención clínica y la investigación clínica y básica. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*. 14 (1):5-7

Romero, M. M., Robles, M., Prieto, R., Bava, A. J. 2011. Coinfección con *Pneumocystis jirovecii* y otros patógenos respiratorios. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 45 (3):471-474

Servicio de Anatomía Patológica INER-Patología. Disponible en: [http://www.iner.salud.gob.mx/contenidos/sub\\_serv\\_auxiliares\\_param](http://www.iner.salud.gob.mx/contenidos/sub_serv_auxiliares_param). Accesado el 06 agosto de 2012.

Smulian, A. G., Sesterhenn, T., Tanaka, R y Cushion, M. T. 2001. The ste3 pheromone receptor gene of *Pneumocystis carinii* is surrounded by a cluster of signal transduction genes. *Genetics*. 157:991-1002

Soler, C. C. 2009. Acceso universal al programa de VIH/SIDA de la Ciudad de México: resultados a seis años. *Salud Pública de México*. 51:26-33

Stchigel, G. A. M. 2000. *Estudio Taxonómico de los Ascomycetes del Suelo*. Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas Básicas. Unidad de Biología y Microbiología, Universidad Rovira I. Virgili, España. 80 p.

Szklo, M. y Nieto, F. J. 2003. Aseguramiento y control de Calidad. Epidemiología intermedia. Conceptos y aplicaciones. Díaz de Santos, España. pp.320- 327. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/spiii/spiii/intermedia.pdf>. Accesado el 06 agosto de 2012.

Van, O. J. J. G., Laufer, M. K., Pérez, M. A., Graham, S. M., Chimbiya, N., Thesing, P. C., Álvarez-Martínez, M. J., Wilson, P. E., Chagomerana, M., Zijlstra, E. E., Taylor, T. E., Plowe, C. V. y Meschnick, S. R., 2007. *Pneumocystis pneumonia* in HIV-Positive adults, Malawi. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (2):325-328

Vázquez, V. L, Belmont, C. A. y Vázquez M. M. E. 2008. Citodiagnóstico estratégico en Neumonía por *Pneumocystis jirovecii (carinii)* **En:** Memorias del 51° Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Patología, A. C. *Patología Revista Latinoamericana*. 46(2):133-134 Disponible en: <http://revistapatologia.com/index.html>. Accesado el 06 agosto de 2012.

Vega, B. R. S. y Reyes, T. G. 2005. Complicaciones infecciosas pulmonares en los pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). *Neumología y Cirugía de Tórax*. 64 (2):48-62

Villasís-Keever, A., Rangel-Frausto, M. S., Ruiz-Palacios, G. y Ponce de León-Rosales, S. 2001. Clinical manifestations and survival trends during the first 12 years of the AIDS epidemic in Mexico. *Archives of Medical Research*. 32:62-65

Wagner, K. R. y Chaisson, R. E. 2004. Pulmonary complications of HIV infection. **En:** Wormser, G.P. *AIDS and Other Manifestations of HIV Infection*. 4° ed. Elsevier Academic Press. London pp. 407-412

Wied, G. L. 1992. History of clinical cytology and outlook for its future. **En:** Wied, G. L., Keebler, C. M., Koss, L. G., Patten, S. F. y Rosenthal, D. L. *Compendium on Diagnostic Cytology, Tutorials of Cytology*. 7°Ed. Tutorials of Cytology, USA pp. 1-20

Web Path 2013. The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. The University of Utah Eccles Health Sciences Library. Disponible en <http://library.med.utah.edu/> Accesado el 23 de abril de 2013.

Young, J. A. 1996. Cytopathology. **En:** Hasleton, P. S. *Spencer's Pathology of the Lung*. 5° ed. Mc Graw Hill Interamericana. USA pp. 1221-1223